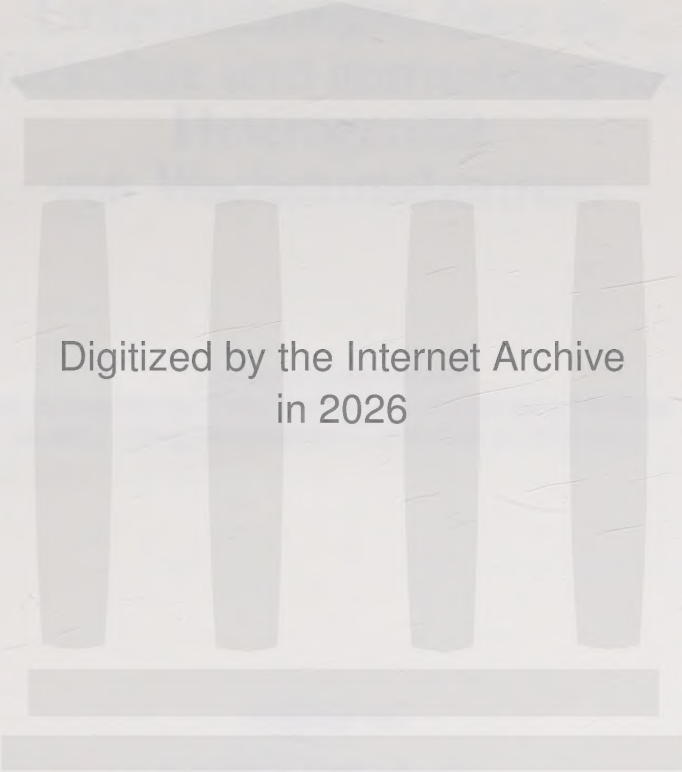


Untersuchungen über die
molekulare und immunologische
Heterogenität
von Wachstumshormon

Sebastian Gallenberger

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555611_0007

Aus der II. Medizinischen Klinik der Universität München
Direktor: Professor Dr. med. E. Buchborn

*

Untersuchungen über die molekulare und immunologische Heterogenität von Wachstumshormon

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Sebastian Gallenberger
aus Irnsing

1976

Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft
(SFB 51)

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter:	Priv.Doz. Dr.med. K. v. Werder
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. E. Buchborn
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 6. 8. 1976



Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. P.C. Scriba für die Aufnahme in die endokrinologische Arbeitsgruppe der II. Medizinischen Klinik der Universität München.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.Do. Dr. K. von Werder für die Überlassung des Themas. Sein Interesse am Vorwärtkommen der Arbeit und seine tatkräftige Hilfe machten erst das Gelingen dieser Arbeit möglich. Die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit mit ihm und seinen Mitarbeitern ließ viel Freude an der Tätigkeit im Labor gewinnen.

Für die rGH-Bestimmung danke ich Fräulein B. Schultz, für die sorgfältige Ausführung der graphischen Darstellungen Herrn L. Bestler und für die photographischen Abbildungen Fräulein F. Haag.

Frau M. Preisendanz besorgte das Schreiben des Manuskripts. Auch ihr ein herzliches Dankeschön.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<u>1. EINLEITUNG</u>	1
Menschliches Wachstumshormon	1
Regulation der Sekretion	2
Biologische Aktivität	3
Immunologische Aktivität	4
Wachstumshormon der Ratte	4
Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	5
<u>2. METHODEN UND VORVERSUCHE</u>	6
2.1. Gelchromatographie	6
2.1.1. Theoretische Grundlagen	6
2.1.1.1. Prinzip der Gelchromatographie	6
2.1.1.2. Auswertung	7
2.1.2. Säulenherstellung	8
2.1.2.1. Reagenzien und Geräte	8
2.1.2.2. Vorbereitung der Säule und des Gels	9
2.1.2.3. Packen des Gelbettes	10
2.1.2.4. Stabilisieren und Prüfen der Füllung	11
2.1.3. Durchführung der Chromatographie	12
2.1.3.1. Auftragen der Proben	12
2.1.3.2. Eluieren und Sammeln der Fraktionen	13
2.2. Radioimmunologische hGH-Bestimmung	14
2.2.1. Prinzip und graphische Darstellung der Eichkurve	14
2.2.2. Radioaktive Markierung des hGH	17
2.2.2.1. Isotopen	17
2.2.2.2. Reagenzien und Geräte	17
2.2.2.3. Jodierung und Berechnung der spezifischen Aktivität	20
2.2.2.4. Zählgeräte	22
2.2.2.5. Nachreinigung	23
2.2.2.6. "Alterung" des markierten Hormons	24

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter:	Priv.Do. Dr.med. K. v. Werder
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. E. Buchborn
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 6. 8. 1976



Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. P.C. Scriba für die Aufnahme in die endokrinologische Arbeitsgruppe der II. Medizinischen Klinik der Universität München.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.Do. Dr. K. von Werder für die Überlassung des Themas. Sein Interesse am Vorwärtskommen der Arbeit und seine tatkräftige Hilfe machten erst das Gelingen dieser Arbeit möglich. Die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit mit ihm und seinen Mitarbeitern ließ viel Freude an der Tätigkeit im Labor gewinnen.

Für die rGH-Bestimmung danke ich Fräulein B. Schultz, für die sorgfältige Ausführung der graphischen Darstellungen Herrn L. Bestler und für die photographischen Abbildungen Fräulein F. Haag.

Frau M. Preisendanz besorgte das Schreiben des Manuskripts. Auch ihr ein herzliches Dankeschön.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<u>1.</u>	<u>EINLEITUNG</u>
	1
	Menschliches Wachstumshormon
	1
	Regulation der Sekretion
	2
	Biologische Aktivität
	3
	Immunologische Aktivität
	4
	Wachstumshormon der Ratte
	4
	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit
	5
<u>2.</u>	<u>METHODEN UND VORVERSUCHE</u>
	6
2.1.	Gelchromatographie
	6
2.1.1.	Theoretische Grundlagen
	6
2.1.1.1.	Prinzip der Gelchromatographie
	6
2.1.1.2.	Auswertung
	7
2.1.2.	Säulenherstellung
	8
2.1.2.1.	Reagenzien und Geräte
	8
2.1.2.2.	Vorbereitung der Säule und des Gels
	9
2.1.2.3.	Packen des Gelbettes
	10
2.1.2.4.	Stabilisieren und Prüfen der Füllung
	11
2.1.3.	Durchführung der Chromatographie
	12
2.1.3.1.	Auftragen der Proben
	12
2.1.3.2.	Eluieren und Sammeln der Fraktionen
	13
2.2.	Radioimmunologische hGH-Bestimmung
	14
2.2.1.	Prinzip und graphische Darstellung der Eichkurve
	14
2.2.2.	Radioaktive Markierung des hGH
	17
2.2.2.1.	Isotopen
	17
2.2.2.2.	Reagenzien und Geräte
	17
2.2.2.3.	Jodierung und Berechnung der spezifischen Aktivität
	20
2.2.2.4.	Zählgeräte
	22
2.2.2.5.	Nachreinigung
	23
2.2.2.6.	"Alterung" des markierten Hormons
	24

	Seite
2.2.3.	Radioimmunoassay 26
2.2.3.1.	Anti-hGH-Antikörper vom Meerschweinchen (SORIN) 26
2.2.3.2.	Anti-hGH-Antikörper von der Ziege 29
2.2.3.3.	Anti-hGH-Antikörper vom Kaninchen 30
2.2.3.4.	Sensitivität und Spezifität der Bestimmung 31
2.3.	Radioimmunologische rGH-Bestimmung 33
2.3.1.	Reagenzien 34
2.3.2.	Radioaktive Markierung des rGH 34
2.3.2.1.	Jodierung 34
2.3.2.2.	Nachreinigung 35
2.3.3.	Radioimmunoassay 37
2.4.	Insulinhypoglykämie-Test (IHT) 39
<u>3.</u>	<u>ERGEBNISSE</u> 41
3.1.	Untersuchungen über menschliches Wachstumshormon 41
3.1.1.	Chromatographische Auftrennung von ^{125}J -markierten Tracern über die Sephadex G-75-Säule 41
3.1.1.1.	^{125}J -hGH, ^{125}J -TSH, ^{125}J -Insulin 41
3.1.1.2.	Rechromatographie der einzelnen ^{125}J -hGH-Peaks 44
3.1.2.	Gelfiltration von exogenem und endogenem "kaltem" (=unmarkiertem) Wachstumshormon 46
3.1.2.1.	Hypophysenpräparationen 46
3.1.2.2.	Serum-hGH von Patienten mit aktiver Akromegalie 50
3.1.2.3.	90-Minuten-Wert nach Insulinhypoglykämie bei Normalpersonen 53
3.1.3.	Immunoreaktives Verhalten der durch Gelfiltration getrennten 3 hGH-Komponenten big-big, big und little 55
3.1.3.1.	Verdünnungsreihen von big-big, big und little hGH 55
3.1.3.2.	Radioimmunoassay mit Peak I, Peak II und Peak III ^{125}J -hGH und big-big, big und little hGH 55

	Seite
3.1.4. Stabilität und Homogenität von big und little hGH	60
3.1.4.1. Behandlung von big hGH mit Guanidiniumchlorid	60
3.1.4.2. Behandlung von little hGH mit Guanidiniumchlorid	62
3.2. Untersuchungen von Ratten- wachstumshormon	64
3.2.1. rGH-Standardpräparationen	64
3.2.1.1. Gelfiltration der Standardpräparationen	64
3.2.1.2. Radioimmunologisches Verhalten der Standardpräparationen	64
3.2.1.3. Immunoreaktives Verhalten der durch Chromatographie isolierten drei rGH-Fraktionen	65
3.2.2. Serum-rGH	69
3.2.3. rGH-Hypophysenextrakte	71
3.2.3.1. Gelfiltration der rGH-Hypophysenextrakte	71
3.2.3.2. Verdünnungskurven der rGH-Hypophysenextrakte	71
<u>4. DISKUSSION</u>	75
<u>5. ZUSAMMENFASSUNG</u>	87
SUMMARY	90
<u>6. LITERATUR</u>	92

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACTH	=	Adrenocorticotropes Hormon
AK	=	Antikörper
E	=	Einheit
FSH	=	Follikelstimulierendes Hormon
GIF	=	"growth hormone inhibiting factor"
GRF	=	"growth hormone releasing factor"
hGH	=	"human growth hormone"
hPL	=	"human placental lactogen"
HVL	=	Hypophysenvorderlappen
IHT	=	Insulinhypoglykämietest
LH	=	Luteinisierungshormon
MG	=	Molekulargewicht
rGH	=	"rat growth hormone"
RIA	=	Radioimmunoassay
S	=	Standardabweichung
SE	=	Standardfehler des Mittelwerts
TSH	=	Thyreotropes Hormon
VK	=	Variationskoeffizient
$\bar{x}$	=	Mittelwert

1.

EINLEITUNG

Das Wachstumshormon wie das Prolaktin sind phylogenetisch alte Hormone, die sich von einem gemeinsamen "Urpeptid" ableiten. Bei beiden Hormonen handelt es sich sowohl um laktotrope als auch um somatotrope Peptide, die direkt in der Peripherie wirken und bei denen sich im Gegensatz zu den glandotropen Hypophysenvorderlappen-Hormonen im Verlauf der Evolution eine ausgeprägte Speziespezifität entwickelt hat (49).

Menschliches Wachstumshormon

Das menschliche Wachstumshormon (human growth hormone = hGH) ist ein einkettiges Proteohormon mit 191 Aminosäuren, zwei Disulfidbrücken und einem Molekulargewicht von 21500. Es unterscheidet sich chemisch, immunologisch und in seiner biologischen Aktivität von anderen tierischen Wachstumshormonen. Beim Menschen zeigt nur Primaten-GH eine biologische Aktivität (49). LI et al. gelang die Synthese des Hormons nach der von ihnen 1966 angegebenen Sequenzanalyse (63). Da dieses synthetische hGH nur eine biologische Aktivität von 10% aufwies, mußte die Struktur nach einer erneuten Analyse 1971 revidiert werden (64). Die Bestimmung von hGH-Spiegeln im Serum wurde erst mit Hilfe der von YALOW und BERSON (110) eingeführten radioimmunologischen Methode möglich. Die normalen basalen Konzentrationen liegen zwischen 0,5 und 5 ng/ml (30) beim Erwachsenen; es wurden jedoch beim Neugeborenen bis auf 50 ng/ml erhöhte Werte und noch höhere Spiegel in der intrauterinen Phase beim Fötus gemessen (57). Die früher üblichen Tests, wie z.B. der Rattentibia-Test (41), eignen sich wegen ihrer geringen Empfindlichkeit nur zur Bestimmung von Hypophysenextrakten. So werden hGH-Präparationen auch biologisch an der Gewichtszunahme hypophysekтомierter Ratten standardisiert (36).

Regulation der Sekretion

Die Regulation der Sekretion wird durch teils stimulierende, teils inhibierende hypophyseotrope Faktoren gesteuert, welche im Hypothalamus von Nervenzellen sezerniert, über ein spezifisches Portalsystem zu den hGH-sezernierenden, azidophilen Zellen der Hypophyse gelangen (59).

1964 demonstrierten DEUBEN und MEITES (25) erstmals eine GRF-Aktivität (GRF = growth hormone releasing factor), 1968 KRULICH et al. (58) den inhibierenden Faktor GIF (= growth hormone inhibiting factor), der kürzlich isoliert und dessen Struktur aufgeklärt werden konnte: Es handelt sich dabei um ein Peptid mit 14 Aminosäuren, das von GUILLEMIN als Somatostatin bezeichnet wurde (16). Sein ubiquitäres Vorkommen im gesamten Organismus - besonders hohe Konzentrationen wurden im Pankreas gemessen - sowie sein Einfluß auf zahlreiche andere Hormone lassen an eine allgemeine Transmitterfunktion denken.

Das synthetisierte hGH wird in den azidophilen Granula der somatotropen Zellen gespeichert und so aus dem Intrazellularraum ausgeschleust. Der Wachstumshormongehalt einer menschlichen Hypophyse beträgt insgesamt etwa 5 mg (99).

Zahlreiche neurale und metabolische Einflüsse führen zu einer Stimulation der Wachstumshormonsekretion: Hypoglykämie, spontan oder Insulin-induziert, sowie ein rascher Blutzuckerabfall ohne Hypoglykämie, Arginininfusionen oder Aminosäuren per os aufgenommen, Streß jeder Art, sei es Operation, Trauma, körperliche oder psychische Belastung, und Hemmung der Großhirnaktivität wie in Schlaf oder Vollnarkose (90, 99). Hemmend auf die Wachstumshormonsekretion wirken Hyperglykämien, Hypercortisismus, ob endogener oder exogener Art, Adipositas, Hypothyreose, Gestagene sowie Alpharezeptorenblocker (73, 90, 99).

Der Insulinhypoglykämietest und die Argininbelastung gelten als potente Provokationstests für die Wachstumshormonsekretion (44, 69, 84) und sind zu Routineuntersuchungen besonders für die Diagnosestellung eines hypophysären Zwergwuchses geworden (70).

Biologische Aktivität

Das Wachstumshormon ist entscheidend verantwortlich für ein normales Körperwachstum und in diesem Sinne ein anaboles Hormon. Entsprechend seiner synergistischen Wirkung zum Insulin fördert es die Eiweißsynthese durch verstärkten Transport von Aminosäuren in die Zelle und bewirkt insgesamt eine positive Stickstoffbilanz.

Auf den Kohlenhydratstoffwechsel wirkt hGH antagonistisch zum Insulin, indem es die Glukoseaufnahme in die Zelle hemmt und gleichzeitig die Lipolyse fördert (90, 101). So läßt sich auch erklären, daß beim total pankreasektomierten Hund eine Hypophys-ektomie zu einer Besserung des Diabetes führt (HOUSSAY-Phänomen). Analog bessert sich die Stoffwechsellage eines Diabetikers nach Hypophysektomie (54).

Wachstumshormon führt im Elektrolytstoffwechsel zu einer Retention von Natrium-, Kalium-, Phosphat- und Chlorid-Ionen. Die von hGH induzierte Aufnahme von radioaktivem Sulfat oder Thymidin in den Tibiaknorpel hypophysektomierter Ratten ist kein direkter hGH-Effekt, da zugesetztes Hormon in vitro versagt, sondern wird von einem hGH-abhängigen Faktor = Sulfation Factor gesteuert (22, 23). Diese Faktoren, es handelt sich um mehrere, werden jetzt Somatomedine genannt. Ein Peptid (Somatomedin C) mit einem Molekulargewicht von etwa 7000 wird in der Leber gebildet und ist der non-suppressible insulin like activity-S (NSILA-S) verwandt, aber nicht mit ihr identisch (32, 57).

Obwohl hGH unerlässlich ist für normales Wachstum in der Kindheit - sein Ausfall verursacht proportionalen Zwergwuchs - sind beim Erwachsenen keine Ausfallssymptome zu beobachten. Dagegen führt eine Mehrsekretion präpubertär zum Krankheitsbild des Gigantismus (60), und beim Erwachsenen zur Akromegalie (21). Bewiesen wird die autonome, vermehrte Wachstumshormonsekretion durch nicht supprimierbare Werte erhöhter Nüchternspiegel nach oraler Glukosebelastung (100).

Immunologische Aktivität

Die radioimmunologisch gemessenen hGH-Konzentrationen lassen sich nicht direkt mit der Aktivität der Akromegalie (Akrenwachstum, diabetische Stoffwechsellaage, Arthropathie usw.) in Beziehung setzen, da für klinisch gleich ausgeprägte Krankheitsbilder die unterschiedlichsten Hormonspiegel verantwortlich sein können - von 10 bis über 1000 ng/ml.

Diese Diskrepanz zwischen Radioimmunoassay und Klinik war Ausgangspunkt weiterer Untersuchungen zur molekularen Heterogenität. BALA et al. (1) führten als erste gezielte gel-chromatographische Untersuchungen durch und fanden radioimmunologisch meßbares hGH auch in höheren Molekulargewichtsbereichen. Neuere Untersuchungen von GOODMAN et al. (38) und GORDON et al. (40) unterschieden zwischen zwei Komponenten, die sie "big" und "little" nannten. Solche höhermolekulare Formen radioimmunologisch meßbarer Peptidhormone konnten für alle ein-kettigen Peptidhormone gezeigt werden: Unter anderen für Insulin (86), Parathormon (8), ACTH (115), und Gastrin (112); ihre Bedeutung ist noch nicht bei allen klar. Es kann sich dabei um Hormonvorstufen, sogenannte Prohormone, handeln, wie es für das Insulin bewiesen werden konnte (93), oder um ein kovalent an Eiweiß gebundenes Hormon wie beim ACTH (115), oder um aggregierte Hormonkomplexe.

Da Prohormone, bedingt durch zusätzliche Aminosäuren, eine veränderte Tertiärstruktur besitzen sollten, wäre auch eine unterschiedliche Immunoreaktivität zu erwarten.

Wachstumshormon der Ratte

Das rGH (= rat growth hormone) wurde früher mit einem Molekulargewicht von 45000 angegeben (26); erst neuere Angaben mit etwa 22000 MG (81) rücken es in eine Größenordnung, die der des hGH entspricht. FROHMAN und STACHURA (33) konnten im Hypophysengewebe der Ratte hochmolekulare Proteine mit rGH-Aktivität nachweisen, sogenanntes "large rat growth hormone",

dem sie eine Prohormonrolle zuschreiben.

Zielsetzung dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte die molekulare Heterogenität von Wachstumshormon bei Patienten mit aktiver Akromegalie untersucht werden. Von diesen Untersuchungen war zu erhoffen, daß sie zur Klärung der Diskrepanz zwischen RIA-gemessenen hGH-Spiegeln und Aktivität der Erkrankung beitragen würden, zumal gezeigt werden konnte, daß die höher molekularen hGH-Fraktionen eine geringere biologische Aktivität aufweisen (39).

Gereinigte hypophysäre hGH-Präparationen, frische Hypophysen-homogenate und Seren von Akromegalen und Patienten mit normaler Hypophysenfunktion nach Stimulation wurden chromatographisch analysiert. Das immunoreaktive Verhalten wurde vor und nach der gelchromatographischen Auftrennung untersucht.

Insbesondere sollte dem Befund nachgegangen werden, wobei nach Insulinhypoglykämie-Stimulation eine Veränderung der hGH-Immunoreaktivität beobachtet wurde (103).

Um zu klären, inwieweit die molekulare und immunologische Heterogenität des Wachstumshormons der Ratte (rGH) mit der des hGH vergleichbar war, wurden für das rGH analoge Untersuchungen durchgeführt: rGH-Immunoreaktivität in Serum und Hypophysengewebe, sowie deren Heterogenität nach Fraktionierung mittels Chromatographie über Sephadex-Säulen wurden untersucht.

2. METHODEN UND VORVERSUCHE

2.1. Gelchromatographie

2.1.1. Theoretische Grundlagen

2.1.1.1. Prinzip der Gelchromatographie

Unter Gelchromatographie versteht man ein chromatographisches Verfahren, durch welches sich Stoffe auf Grund von Molekulargewichtsunterschieden trennen lassen. Gele bestehen definitionsgemäß meist aus zwei Komponenten: Der dispergierten Substanz, also dem Gelbildner, und dem Dispersionsmittel = dem Lösungsmittel. Beide Systeme müssen in sich zusammenhängend sein; dann können kleine Moleküle praktisch mit gleicher Geschwindigkeit diffundieren wie in reiner Lösung. Das Gelgerüst besteht in der Regel aus Makromolekülen, die mehrfach miteinander vernetzt sind.

1959 fanden PORATH und FLODIN (75) ein universell anwendbares Dextrangel, das jetzt industriell hergestellt wird und unter dem Namen Sephadex vertrieben wird. In Zusammenhang damit führten sie den Namen Gelfiltration ein.

Sephadex ist ein modifiziertes Dextran, dessen Polysaccharidketten zu einem dreidimensionalen Netz so miteinander verknüpft sind, daß winzige Kügelchen = Perlen mit einem Durchmesser unter 100 μ entstehen (74). Sein stark hydrophiler Charakter beruht auf dem hohen Gehalt an Hydroxylgruppen. In Wasser und Elektrolytlösungen quellen daher die Sephadexperlen erheblich und bilden dabei ein Gel mit einer Vielzahl von Poren, deren Größe vom Vernetzungsgrad der Matrix abhängt.

Gele mit hohem Quellungsgrad, bei denen der Matrixanteil nur klein ist, eignen sich zum Fraktionieren hochmolekularer Substanzen. Die kompakteren Typen mit geringem Quellungsgrad bewähren sich beim Trennen im niedermolekularen Bereich. Schematisch läßt sich eine Trennung folgendermaßen beschreiben: Moleküle, die größer als die Poren im Sephadex-Gel sind, die damit über seiner

Ausschlußgrenze liegen, dringen nicht in die Gelperlen ein und wandern daher stets in der Lösungsphase außerhalb der Partikel = Ausschlußvolumen. Sie werden somit zuerst eluiert. Kleinere Moleküle dringen dagegen je nach ihrer Größe in die Gelpartikel ein. Sie besitzen ein größeres Verteilungsvolumen und werden daher verzögert in Reihenfolge abnehmender Molekülgröße eluiert.

2.1.1.2. Auswertung

Das Gesamtvolumen einer fertig gepackten Säule (V_t = total volume) setzt sich demnach aus drei Anteilen zusammen:

Dem Volumen zwischen den Gelkörnern (V_o = outer volume), dem Lösungsmittel innerhalb der Gelpartikel (V_i = interior volume) und dem Volumen der Gelmatrix (V_m).

$$V_t = V_o + V_i + V_m$$

Als charakteristischer Parameter für das Verhalten eines Stoffes bei der Gelfiltration wird sein Elutionsvolumen (V_e) gemessen. Diese direkte Messung erlaubt nur den Vergleich an der gleichen Gelpackung. Unabhängig von der Geometrie, aber noch empfindlich gegenüber Unterschieden in der Packungsdichte ist der Quotient V_e / V_o als relatives Elutionsvolumen.

Unabhängig auch von der Packungsdichte ist der K_D -Wert:

$$K_D = \frac{V_e - V_o}{V_i}$$

Das Problem ist hier die genaue Bestimmung von V_i . Als Annäherungsfaktor gilt für Sephadex G-75: $V_i = 1,4 \times V_o$.

Rein theoretisch ist der K_D -Wert der Anteil des inneren Volumens, den ein bestimmter Stoff bei einem bestimmten Gel einnehmen kann, und dürfte so nicht größer als 1 werden. In der Praxis trifft dies so gut wie nie zu, da neben der Unsicherheit in der Bestimmung von V_i noch die Affinität einzelner Stoffe zum Dextran eine Rolle spielt (43). In einem bestimmten System ist der K_D -Wert

jedoch ein guter Parameter, um das chromatographische Verhalten von Stoffen an Säulen verschiedener Größe und Packungsdichte vergleichen zu können.

2.1.2. Säulenherstellung

2.1.2.1. Reagenzien und Geräte

- 1.) Sephadex G-75 (Pharmacie Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) Lot.No. 4184, Particle size 40-120 μ
- 2.) 0,05 M Phosphatpuffer nach Sörensen, pH 7,5
- 3.) 0,07 M Veronalpuffer, pH 8,6
- 4.) Serumalbumin vom Rind, trocken, reinst, elektrophoretischer Reinheitsgrad 100% (Behringwerke AG, Best.Nr. ORHD)
- 5.) Natriumazid NaN_3 MG 65,01 (Reagenzien Merck, Art.Nr. 6688)
- 6.) Blue Dextran 2000 MG 2 000 000 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden)
- 7.) Exsikkatorfett (Hahnenfett) (Reagenzien Merck, Art.Nr. 4318)
- 8.) Glasperlen 0,5 mm Durchmesser
- 9.) 1,20 m langes Glasrohr, 3 cm Durchmesser, mit eingeschliffenem Glasstopfen, am anderen Ende kapillarig ausgezogen
- 10.) Isomatec 13 Kanal Micropumpe
- 11.) Cenco Magnetrührer (Breda, Niederlande)
- 12.) Fraktionssammler Linear II (Fa.Serva-Technik, Heidelberg), mit 4 Block Standardröhrchen, 15 - 18 mm Durchmesser, 30 ml Inhalt; mit 4 Block Makroröhrchen, 30 mm Durchmesser, 100 ml Inhalt
- 13.) Kühlbox mit Temperaturbereich von $- 20^{\circ}\text{C}$ bis $+ 10^{\circ}\text{C}$ (Fa.Serva-Technik, Heidelberg)

- 14.) UV-Monitor, Meßbereich bei 253,7 nm, Doppelstrahlmethode (Fa.Serva-Technik, Heidelberg)

2.1.2.2. Vorbereitung der Säule und des Gels

Wir verwenden eine 1,20 m hohe Glassäule mit 3 cm Durchmesser. Das untere Ende ist kapillarartig ausgezogen und trägt eine Glasfritte als Bodenstück. Der Totraum unter der Fritte wird mit Glasperlen und Glaswolle auf ein Minimum verkleinert.

Über der Glasfritte soll eine mindestens 1 cm hohe Schicht von Glasperlen liegen, um zu vermeiden, daß später Gelpartikel die Poren verstopfen und so zu einer Verminderung der Durchlaufgeschwindigkeit führen. Das obere Ende wird mit einem konisch eingeschliffenen Glasstopfen, durch den ein Zuleitungsstück führt, abgeschlossen.

Wenn man - wie in unserem Fall - ein ganz normales Glasrohr als Säulenkörper benützt, so erweist es sich als notwendig, große Sorgfalt auf die Reinigung zu verwenden. Am einfachsten gelingt dies mit Chromschwefelsäure und Äther zum Entfetten und Trocknen. Verstopfungen der Glasfritte mit Gelpartikeln lassen sich freilich nur mit hochprozentiger Salzsäure unter einer Wasserstrahlpumpe beseitigen.

Als Gel wählten wir Sephadex G-75 von der Firma Pharmacia, Uppsala, das sich mit einem Trennbereich von MG 3 000 - 70 000 für unsere Versuche als am besten geeignet erwies. Die Trennschärfe und der Durchfluß einer Säulenfüllung hängen beträchtlich von der Vorbereitung des Gels ab. Das Trockengel - etwa 50 g für eine Füllung - wird zunächst in ein ausreichendes Volumen Flüssigkeit eingerührt und braucht dann bis zum vollständigen Durchquellen mindestens 24 Stunden. Dabei soll das Quellungsmedium einen fünf- bis zehnfachen Überstand bilden. Wir verwenden als solches aqua dest. und äquilibrieren später mit dem Elutionspuffer. Bei kleineren Säulen ist es natürlich sinnvoll, gleich in Puffer zu quellen. Beim Packen der Säulenfüllung bilden sich leicht Luftblasen, die zu ungleichmäßigem Durchfluß und schlechten Trennungen führen. Deshalb ist darauf zu achten,

daß

1. das Trockengel langsam und lange genug in das Quellmedium eingerührt wird, um eingeschlossene Luft entweichen zu lassen und daß

2. das Quellmedium die gleiche Temperatur besitzt, wie der Raum, in dem die Säule stehen soll, damit nicht spätere Erwärmung der Gelsuspension in der Säule zum Ausfällen von Bläschen führt.

2.1.2.3. Packen des Gelbettes

Richtiges Packen einer Säule ist ausschlaggebend für ihre Trennleistung. Die Vorkehrungen, die man treffen muß, um ein gleichmäßiges Gelbett mit guten Durchflußeigenschaften zu erhalten, hängen von der verwendeten Gelart ab. Die geringsten Schwierigkeiten sind mit den niederen Sephadex-Typen G-10 bis G-50, die sich durch harte Beschaffenheit und geringes Quellvermögen auszeichnen, zu erwarten. FLODIN (29) hat in seiner methodischen Untersuchung der Gelfiltration eine einfache Vorrichtung beschrieben, die sich für diese Geltypen eignet; DETERMANN (24) modifizierte diese weiter. Es handelt sich bei beiden im Prinzip um ein Füllen per Hand, wobei die Säule mit einem Einfüllrohr, welches das überschüssige Gel bzw. Lösungsmittel aufnimmt, verlängert wird. Eine gleichmäßige Sedimentation wird durch variable Öffnung des Ausfuhrschlauches erreicht. Für das von uns verwendete Sephadex G-75 zeigten sich diese Methoden unzureichend, da uns so nie eine wirklich homogene Packung gelang. Als praktikabelste Lösung erwies sich, das Gel über eine Schlauchleitung auf die Säule zu pumpen. Zunächst wird die gereinigte Säule bei geschlossenem Auslauf völlig blasenfrei mit aqua dest. gefüllt. Es ist darauf zu achten, daß im Auslaufsystem keine Luft eingeschlossen bleibt. Die Säule wird senkrecht eingespannt und oben mit einem eingefetteten Glasstopfen, durch den die Zuleitung führt, luftdicht abgeschlossen. Das gequollene Gel wird in einem Volumen von etwa doppelter Gelhöhe mit einem Magnetrührer während der gesamten

Füllungszeit aufgerührt und über eine Isomatec-Pumpe auf den Säulenkopf geführt.

Sobald die Pumpe in Betrieb gesetzt wird, kann der Auslauf der Säule geöffnet werden, denn es kann nur so viel Wasser abfließen, als Gelsuspension zugeführt wird. Während des Füllens lassen sich drei Zonen beobachten: Die gleichmäßig wachsende, sedimentierte Gelpackung unten, eine mehr oder weniger dichte Gelsuspension in der Mitte und klares Lösungsmittel ganz oben. Die Pumpgeschwindigkeit beträgt bis zu dreiviertel der endgültigen Höhe 3 ml/Min. und wird dann auf 1,5 ml/Min., was der späteren Elutionsgeschwindigkeit entspricht, reduziert.

Diese Anordnung erlaubte es uns, Säulen beliebiger Höhe bei geringem Arbeitsaufwand gleichmäßig und blasenfrei zu packen.

2.1.2.4. Stabilisieren und Prüfen der Füllung

Handelt es sich bei der Säule um ein gewöhnliches Glasrohr, so ist es zweckmäßig, die ebene Oberfläche mit einem genau eingepaßten Filtrierpapierstück zu stabilisieren (24). Wir verwendeten dafür eine Folie aus gepreßter Glaswolle, die keine Adsorption von Serum oder anderen Proteinlösungen zeigte. Die fertiggepackte Säule wird noch einige Zeit mit dem jeweils gewünschten Trennmedium vorgespült, mindestens mit dem 3-fachen Volumen der Säulenfüllung, um eine sichere Äquilibration zu erreichen. Dem Elutionspuffer, anfangs 0,07 M Veronalpuffer, pH 8,4, dann ausschließlich 0,05 M Phosphatpuffer nach Sörensen, pH 7,5, wird als Bakterio- und Fungizid Natriumazid in einer Konzentration von 0,02% zugesetzt. Dadurch werden die Säulen, zumindest was das mikrobielle Wachstum betrifft, beliebig lange haltbar. Natriumazid beeinflusst in dieser Konzentration auch den Radioimmunoassay nicht und ist somit bei allen Elutionen bedenkenlos verwendbar.

Da der Elutionspuffer proteinfrei gehalten werden soll, ist es notwendig, die Säule mit Albumin zu "coaten", um unspezifische Bindungsstellen des Polydextrans abzusättigen. Auf eine frische Säule werden 10 ml 5% Rinderalbumin gegeben und vor jeder weiteren Elution wird mit 5 ml vorgespült.

Vor der ersten Trennung wird die Homogenität der Säulenfüllung durch einen Testlauf mit Blue Dextran 2000 von der Firma Pharmacia geprüft. Beim Beobachten der wandernden Zone dieses hochmolekularen Farbstoffes läßt sich die Qualität der Packung gut beurteilen. Optimal ist eine schmale, scharf begrenzte Farbbande. Blue Dextran läuft wegen seines hohen MG von 2000 000 nur im äußeren Volumen = V_0 der Gelpackung, und somit entspricht sein Elutionsvolumen diesem. Als Elutionsvolumen gilt dabei das Volumen an Elutionspuffer, das zwischen Auftragen der Probe und ihrem Erscheinen im Auslauf eluiert wird. Blue Dextran ist also gleichzeitig ein idealer Meßparameter für V_0 .

2.1.3. Durchführung der Chromatographie

Nach Äquilibration mit dem gewünschten Trennmedium und "Coaten" mit Albumin ist die Säule arbeitsbereit.

2.1.3.1. Auftragen der Proben

Beim Auftragen der Probe geht es darum, eine scharfe Zone des zu trennenden Substanzgemisches auf die Gelpackung aufzubringen. Man muß aber unbedingt vermeiden, daß Luft in das Gelbett eindringt, d.h. daß die Säule "trocken läuft". Wir bevorzugen folgenden Arbeitsgang:

Die Säule wird vom Zufluß abgehängt und der Auslauf geöffnet. Den Überstand läßt man durchlaufen oder entfernt ihn. Wenn der Rest eben eingesickert ist, trägt man die Probelösung mit einer Pipette vorsichtig auf, ohne daß Gel aufgewirbelt wird. Nachdem die Probe eben vollständig eingezogen ist, wäscht man die Geloberfläche und die mit der Probe in Berührung gekommene Glaswand mit Elutionspuffer nach und läßt erneut einsickern.

Erst dann wird völlig mit Puffer aufgefüllt und die kontinuierliche Zuleitung angeschlossen.

2.1.3.2. Eluieren und Sammeln der Fraktionen

Während der Elution wird der Durchfluß durch eine Isomatec-Pumpe konstant gehalten. Die Elutionsgeschwindigkeit wird so eingestellt, daß sie unter der bei freiem Fluß der Säule erreichbaren liegt. Sie betrug meist 1,5 ml/Min., was im Vergleich zu den in der Literatur angegebenen Werten hoch ist. Da eine Verkleinerung der Durchflußrate bis auf 0,2 ml/Min. keine schärfere Trennung ergab, bestand kein Anlaß, von dieser schnellen Elutionsgeschwindigkeit abzugehen.

Das Eluat wird von einem Linear II Fraktionssammler (Fa. Serva-Technik, Heidelberg) in beliebig einstellbaren Fraktionen gesammelt. Die Fraktionsgröße kann über Zeit, Tropfenzahl oder Siphon gesteuert werden. Wir bevorzugen die Tropfenzählung, da sie am genauesten ist. Dabei entsprechen 125 Tropfen etwa 10 ml, der meist gebrauchten Fraktionsgröße.

Da der Elutionspuffer stets proteinfrei ist, ist es notwendig, in die Sammelröhrchen Albumin vorzugeben, damit das Hormon nicht an der Wand haften bleibt. Bei einer Fraktionsgröße von 10 ml wird in jedes Röhrchen, ausgenommen die, die dem äußeren Volumen V_0 entsprechen, 1 ml 5,5% Rinderalbumin in 0,05 M Phosphatpuffer gegeben, wodurch dann in der gesammelten Fraktion eine Eiweißkonzentration von 0,5% erreicht wird.

Alle Elutionen werden bei Zimmertemperatur durchgeführt, der Fraktionssammler und damit die jeweils bereits gesammelten Proben stehen in einer dafür entwickelten Kühlbox (Fa. Serva-Technik, Heidelberg), die einen Temperaturbereich von $+10^{\circ}\text{C}$ bis -20°C leistet. Die gesammelten Fraktionen können so bei $+4^{\circ}\text{C}$ mindestens 24 Stunden stehen bleiben, ohne daß Meßverluste eintreten. Proben, die erst später bestimmt werden sollen, werden eingefroren und bei -18°C gelagert.

Bei der Gelfiltration von Seren wird die Eiweißkonzentration des Eluats durch einen UV-Monitor (Fa.Serva-Technik, Heidelberg) kontinuierlich aufgezeichnet. Der Meßkopf mit einer Durchlaufküvette wird dem Auslaufsystem der Säule zwischengeschaltet und mißt als Doppelstrahler die Extinktion des durchlaufenden Eluats. Durch Signalanschluß an den Fraktionenzähler werden auch die einzelnen Fraktionen markiert. Bei normaler Eichung dieses Geräts werden Eiweißkonzentrationen bis 10 mg% erfaßt.

2.2. Radioimmunologische hGH-Bestimmung

2.2.1. Prinzip und graphische Darstellung der Eichkurve

Die radioimmunologische Methodik wurde 1960 von YALOW und BERTSON (110) für die Bestimmung von Insulin entwickelt und dann von HUNTER und GREENWOOD (53) und UTIGER et al. (97) für das Wachstumshormon eingeführt. Das Prinzip des Radioimmunoassays läßt sich mit folgenden zwei kompetitiven Reaktionen darstellen:

freies radioaktiv markiertes Hormon + spezif.Antikörper
(= heißes Hormon)

= antikörpergebundenes markiertes Hormon

freies nicht markiertes Hormon + spezif.Antikörper
(= kaltes Hormon)

= antikörpergebundenes kaltes Hormon

Das reversibel an den Antikörper gebundene markierte Hormon wird vom kalten Hormon kompetitiv aus seinen Bindungsstellen verdrängt. Das Verhältnis von antikörpergebundenem zu freiem markiertem Hormon, bezeichnet als B/F Ratio ("bound/free"), wird mit steigender Konzentration an kaltem Hormon kleiner. Verdünnt man also eine bekannte Standardkonzentration herunter, so läßt sich aus dieser Standardreihe eine Eichkurve aufzeichnen.

Alle Proben enthalten gleiche Mengen an markiertem Hormon und an Antikörper; sie unterscheiden sich nur in den Konzentration an kaltem Hormon, sei es als bekannte Standardkonzentration oder als zu bestimmende, unbekannte Proben. Um die B/F-Ratio messen zu können, muß zuerst der Antigen-Antikörper-Komplex vom freien Antigen = Hormon getrennt werden. Zu diesem Zweck sind verschiedene Methoden entwickelt worden. YALOW und BERSON (111) beschreiben eine "hydrodynamic flow" genannte Methode und die "paper strip" Elektrophorese; Charcoal (50) und Talkum (83) werden als Adsorbentien des freien Hormons verwendet oder der Antikörper wird komplexartig an Kunststoffgefäße, "solid phase" (18, 19), oder Sephadex (106) gebunden.

Nach einer anderen Methode erfolgt die Trennung durch die Ausfällung des gebundenen Anteils mit Natriumsulfatlösung (45). Eleganter tut dies auch die heute meist verwendete Doppelantikörpermethode, bei der ein 2. Antikörper den Hormon-spezifischen = 1. Antikörper-Komplex präzipitiert (35, 87, 97). Ein Gammacounter mißt dann nach Entfernung des Überstandes die Radioaktivität des gebundenen Anteils. In Relation zu der gesamt zugegebenen Radioaktivität läßt sich so der B/F-Quotient berechnen, den YALOW und BERSON (111) in ihrer Eichkurvendarstellung als eine Funktion der bekannten hGH-Konzentrationen auftragen. Bei Linearität von Abszisse und Ordinate ergibt sich eine Hyperbel. Die B/F-Quotienten der zu bestimmenden Proben entsprechen dann bestimmten auf der Eichkurve abgelesenen Hormonkonzentrationen. Diese Art der Eichkurvendarstellung hat den Nachteil, eine völlig nicht lineare Kurve zu erhalten und einen von Test zu Test stark schwankenden B_0 -Wert zu haben, d.h. die gebundene Radioaktivität derjenigen Probe, die nur markiertes Antigen, aber kein unmarkiertes enthält. Deshalb bilden wir den stabileren Quotienten B/B_0 und erhalten damit einen konstanten Anfangspunkt der Kurve mit $B/B_0 = 100\%$. Teilt man noch die Abszisse nach dem dekadischen Logarithmus ein, so resultiert daraus eine sigmoidale Kurvenform mit einer Geraden in der Mitte. Durch die Logit-Darstellung nach ROBBARD (79) läßt sich diese

noch weiter ausdehnen, freilich wächst damit die Fehlermöglichkeit. MARSCHNER et al. (67) führten vor Kurzem an unserer Klinik ein neues Verfahren zur Berechnung eines "stetigen, optimal geglätteten Kurvenzuges aus experimentellen Daten radioimmunologischer Standardkurven" ein. Die mathematische Basis dazu ist die "Spline-Approximation" (67), die allerdings nur durch Computer durchführbar ist, da hierbei aufwendige Rechenoperationen in Schleifen einige hundert Male durchlaufen werden müssen.

Das Programm zur Berechnung von Hormonkonzentrationen aus Zählraten läuft auf einer 48 kb-Anlage vom Typ Siemens O 404/3 mit Wechselflattenspeicher, Lochstreifenperipherie und Plotter. Die Eingabe der Zählraten erfolgt mit Lochstreifen in eine Plattendatei, in der sie dann dem 26 kb umfassenden Hauptprogramm zur Verfügung stehen. Der Plotter zeichnet dann die optimierte Eichkurve auf und der Drucker liefert die automatisch berechneten Hormonkonzentrationen innerhalb kürzester Zeit.

Entscheidend für die Güte eines Radioimmunoassays ist, daß sich die Standardpräparation mit der unbekannten Substanz, die man messen will, immunoreaktiv identisch verhält (7, 10). Um dies zu prüfen, mißt man eine Verdünnungsreihe und zeichnet eine Verdünnungskurve in folgender Weise auf: Der B/B_0 -Quotient, der am steilsten und genauesten Teil der Standardkurve zwischen 0,5 und 1,5 ng/ml liegt, wird für die Bestimmung der hGH-Konzentration ausgewählt. Die bei dieser Verdünnung abgelesene Konzentration wird als Ausgangspunkt angenommen, von ihr aus werden die Konzentrationen der übrigen Verdünnungen berechnet und der gemessene B/B_0 -Quotient als Funktion dieser Konzentrationen in das Koordinatensystem eingezeichnet. Daraus resultiert eine Verdünnungskurve, die im Fall von Immunoidentität mit der Eichkurve zusammenfällt.

2.2.2. Radioaktive Markierung des hGH

2.2.2.1. Isotopen

Für die radioaktive Markierung von hGH werden die Isotopen ^{131}J und ^{125}J verwendet. ^{131}J besitzt Beta- und Gamma-Strahlung mit einer Halbwertszeit von 8,09 Tagen und einer hohen spezifischen Aktivität. Diese relativ geringe Halbwertszeit von ^{131}J ist besonders für Immunoassays mit mehreren Tagen Inkubationszeit recht ungünstig. Deshalb wurde für die hGH-Markierung bald ^{125}J bevorzugt (61). Dieses Jod-Isotop (Beta-Strahler) weist bei einer spezifischen Aktivität des trägerfreien Isotops von 8 - 15 Ci $^{125}\text{J}/\text{mg J}$ eine Halbwertszeit von 60 Tagen auf.

Bei der Markierung wird das zu elementarem Jod oxydierte Jodid in die Thyrosinreste des Proteohormons eingebaut. Wachstumshormon enthält, bezogen auf ein Molekulargewicht von 21 500, acht Thyrosinreste, von denen jeder mit zwei Jod-Atomen substituiert werden kann. BERSON und YALOW (6) halten ein Durchschnittsverhältnis von 1 Atom Jod / 1 Molekül hGH für optimal, da zu hoch markierte Hormone ihr immunoreaktives Verhalten ändern. Bei der von GREENWOOD et al. (42) eingeführten Methode dient Chloramin T als Oxydationsmittel, während durch Natriumbisulfit, das den Rest des freien Jod wieder zu Jodid reduziert, die Reaktion gestoppt wird. Das danach zugegebene Kaliumjodid soll als Trägerjodid eine unspezifische Adsorption an die Glaswand verhindern. Das ^{125}J -hGH des später beschriebenen SORIN-Kits wird nach einer von ROSA (82) entwickelten elektrolitischen Markierungsmethode hergestellt.

2.2.2.2. Reagenzien und Geräte

- 1.) ^{125}J -Natriumjodid zur Eiweißmarkierung ohne Reduktionsmittel, spezifische Aktivität 8 - 15 Ci $^{125}\text{J}/\text{mg J}$, Gesamtaktivität 2 mCi $\pm$ 20% (Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt, Best.Nr. J 5006).
- 2.) Menschliches Wachstumshormon (= hGH), Wilhelm-Präparation NIH-GH: HS/394 mit einer biologischen hGH-Aktivität von 2 I.E./mg und Prolaktin-Aktivität von 6 I.E./mg (National Institute of Health).

- 3.) Serumalbumin vom Rind, trocken, reinst, elektro-phoretischer Reinheitsgrad 100% (Behringwerke AG, Best.Nr. ORHD)
- 4.) Chloramin T, MG 281,69 (Reagenzien Merck Nr. 2426)
- 5.) Natriummetadisulfit, trocken, MG 190,1 (Reagenzien Merck, Nr. 6528)
- 6.) Kaliumjodid, neutral, MG 166,01 (Reagenzien Merck, Nr. 5043)
- 7.) 5,5-Diäthylbarbitursäurenatriumsalz zur Analyse (Barbitalnatrium), MG 206,18 (Reagenzien Merck, Nr. 6318)
- 8.) Di-Natriumhydrogenphosphat-Hydrat zur Analyse, MG 177,99 (Reagenzien Merck, Nr. 6580)
- 9.) Kaliumdihydrogenphosphat nach Sörensen, MG 136,09 (Reagenzien Merck, Nr. 4873)
- 10.) 5 N Salzsäure
- 11.) 2 N Natronlauge (Reagenzien Merck, Nr. 9136)
- 12.) Sephadex G-50 Fine (Pharmacie Fine Chemicals, Uppsala, Schweden, Lot.Nr. 127, Particle Size 20-80 u)
- 13.) Fraktionssammler
- 14.) Vortex-Genie-Mixer, Patent 3 061 280 (Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz)

Angesetzte Puffer und Lösungen

- 1.) 0,5 M Phosphatpufferstammlösung nach Sörensen
 KH_2PO_4 6,81 g auf 100 ml H_2O
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 44,5 g auf 500 ml H_2O
Unter pH-Kontrolle zusammengießen bis pH 7,5 erreicht ist.
- 2.) Daraus entsteht durch 1:10 Verdünnung 0,05 M Phosphatpuffer, z.B. 100 ml von 1.) auf 900 ml aqua bidestillata
- 3.) 0,1 M Na-Veronalpuffer, pH 8,6
20,6 g Barbital-Natrium auf 1000 ml aqua bidest.
pH 8,6 wird mit 5 N Salzsäure eingestellt.
- 4.) 0,07 M Na-Veronalpuffer
7 Volumina 0,1 M Na-Veronalpuffer auf 3 Volumina H_2O
z.B. 350 ml 0,1 M Na-Veronalpuffer auf 150 ml H_2O

- 5.) 5%-Rinderalbumin-Veronalpuffergemisch zur Sättigung der Sephadex-Säule, z.B. 250 mg Rinderalbumin auf 5 ml 0,07 M Na-Veronalpuffer
- 6.) 20%-Rinderalbumin-Veronalpuffergemisch zur Vorgabe in die Sammelröhrchen des Fraktionssammlers
- 7.) hGH, reinst, wird mit 0,05 M Phosphatpuffer auf 2 ug/10 ul verdünnt und in 50 ul Fraktionen abgeteilt
- 8.) Chloramin T-Lösung
50 mg Chloramin T auf 10 ml 0,05 M Phosphatpuffer.
Die Lösung wird erst kurz vor Gebrauch angesetzt und in einem lichtundurchlässigen Behälter aufbewahrt.
- 9.) Natriummetabisulfit-Lösung
20 mg Natriummetabisulfit auf 10 ml 0,05 M Phosphatpuffer
- 10.) Kaliumjodid-Lösung
50 mg KJ auf 5 ml 0,05 M Phosphatpuffer.

Vorbereitung der Sephadex-G-50 Säule

1.) 2,5 g Sephadex G-50 Fine in 150 ml 0,07 M Na-Veronalpuffer einrühren und mindestens drei Stunden quellen lassen.

2.) Säulenglasrohr (30 x 1 cm; mit Graduierung) reinigen, mit der Wasserstrahlpumpe trocknen und mit Äther von Fett befreien. Nach dem Trocknen wird der Ausfluß des Rohres mit etwas Glaswatte abgedichtet und darauf eine Schicht Glasperlen gegeben. Die Abdichtung darf nicht zu fest sein, da sonst die Durchflußgeschwindigkeit der Säule zu gering wird.

3.) Glasrohr lotrecht befestigen, mit Na-Veronalpuffer vor-spülen, gequollenes Gel eingießen und mindestens zwei Stunden sich absetzen lassen, darauf nachwaschen mit 10 ml 0,07 M Na-Veronalpuffer.

4.) Wenn die Oberfläche trocken ist, läßt man 2 ml der 5% Albumin-Pufferlösung einziehen, wäscht mit 20 ml 0,07 M Na-Veronalpuffer nach und beläßt etwa 2 ml Überstand. Dieses Ab-sättigen der unspezifischen Proteinbindungsstellen des Sephadex-

Gels erlaubt eine hohe Wiederfinderate des markierten Proteohormons.

5.) Das Eluat wird mit einem Fraktionssammler in dreißig 1 ml-Fractionen aufgefangen. In die Eppendorf-Sammelröhrchen werden 20 ul einer 20% Albuminlösung vorgegeben.

2.2.2.3. Jodierung und Berechnung der spezifischen Aktivität

In ein konisches Glasröhrchen werden nacheinander einpipettiert:

20 ul ^{125}J -Lösung (entspricht 500 uCi)

20 ul 0,5 M Phosphatpuffer

20 ul hGH-Lösung (entspricht 4 ug)

20 ul frisch angesetzte Chloramin T-Lösung

Dieses Gemisch wird 25 - 30 Sekunden auf einem Vortex-Mixer geschüttelt; dann wird zugegeben:

100 ul Natriummetasulfit-Lösung, zum Stoppen der Reaktion,

200 ul Kaliumjodid-Lösung, neutral, als Trägerjodid.

Nach kurzem Schütteln wird dieses Reaktionsgemisch mit einer Glaskapillarpipette vollständig auf die Sephadex-Säule übertragen. Das Reagenzgefäß wird nochmals mit 200 ul KJ-Lösung und 200 ul Puffer nachgespült, diese Waschlösung wird gleichfalls auf die Säule gegeben.

Durch die Elution über die Sephadex-Säule werden das markierte Proteohormon und das nicht in die Reaktion eingegangene, freie Jodid wieder getrennt. Eluiert wird mit 0,07 M Veronalpuffer. Je 1 ml des Eluats wird in 30 Eppendorf-Plastikröhrchen aufgefangen. In Röhrchen 4-30 wurden 20 ul einer 20% Albuminlösung vorgegeben, womit dann eine endgültige Proteinkonzentration des Eluats von 0,4% erreicht wird. Die Radioaktivität eines jeden Röhrchens wird mit einem digitalen Gammazähler der Fa. Telefunken gemessen.

Die graphische Darstellung des Eluats zeigt Abbildung 1 (oben). Der erste Peak, der sogenannte Proteinpeak, enthält das markierte

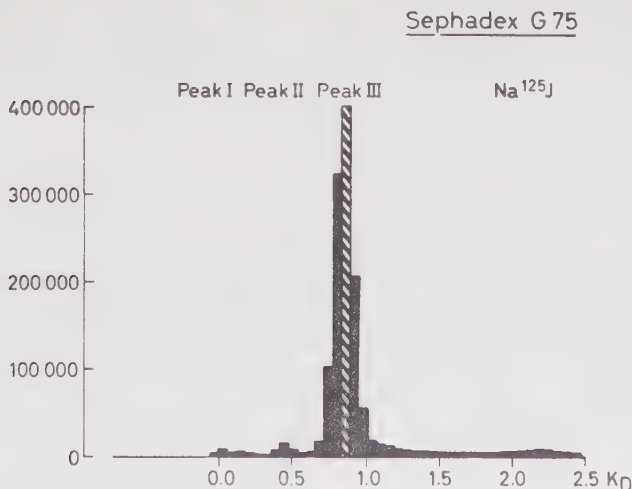
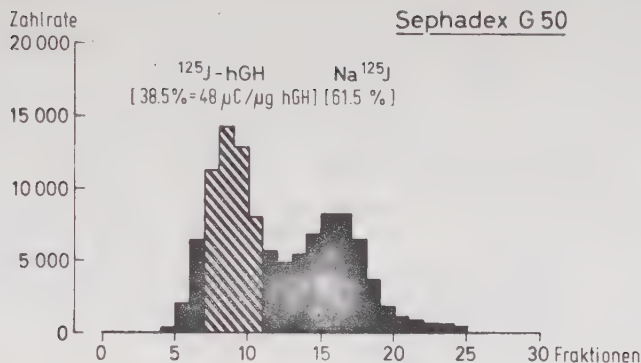


Abb. 1: Elutionsprofil des $^{125}\text{J-hGH}$ -Markierungsgemischs. Trennung des ^{125}J -markierten Proteins und $\text{Na } ^{125}\text{J}$ durch Sephadex G-50 Chromatographie (oben). Nachreinigung des Proteinpeaks (schraffiert) über Sephadex G-75 (Säule 3 x 110 cm). Peak III stellt das ^{125}J -markierte hGH dar, das bei K_D 0,8 eluierte (unten). Die schraffierte Fraktion diente als Tracer im hGH-RIA. Die Zählrate ist in Impulsen pro Minute angegeben.

Wachstumshormon. Im zweiten Peak, dem sogenannten Salzpeak, wird das freie, nicht gebundene Markierungsjodid und das Trägerjodid eluiert.

Ein guter Parameter für den Erfolg der Jodierung ist die spezifische Aktivität, worunter man die an das Hormon gebundene Radioaktivität in Ci pro g Hormonprotein versteht. Zieht man von der Gesamtaktivität des zugegebenen ^{125}J die Radioaktivität an Pipette und Reaktionsgefäß ab, so erhält man die Aktivität, die auf die Säule übertragen wurde, = "Säulenload". Addiert man die Zählraten aller Proben, so kommt man zur Aktivität des Gesamteluats. Diese sollte bei optimaler Vorbereitung der Säule annähernd dem "Säulenload" gleich sein. Der Anteil des Proteinpeaks an der Gesamtaktivität gibt an, mit wieviel Aktivität das zugegebene Wachstumshormon markiert wurde. Durch Einsetzen der absoluten Werte erhält man somit die spezifische Aktivität, die sich bei unseren Markierungen in der Regel zwischen 15 und 50 $\mu\text{Ci}^{125}\text{J}/\text{ng hGH}$ bewegte.

2.2.2.4. Zählgeräte

Die Gammastrahlung der Markierungsproben wird am digitalen Strahlungsmeßplatz Ms Str 610/1 (Fa. Telefunken) gemessen. Dieses Gerät besitzt eine relativ geringe Empfindlichkeit, die aber für die hohen Aktivitäten, mit denen man bei der Jodierung zu tun hat, völlig ausreicht. Außerdem schränkt die Handbedienung die Anwendung stark ein. Da zu einer radioimmunologischen Bestimmung Zählzeiten von 2 Minuten bei bis zu 500 Einzelproben pro Ansatz nötig sind, wurden zahlreiche automatisch arbeitende Geräte entwickelt. Wir benützen zwei Bohrlochkristall-Szintillationszähler, nämlich den Reagenzglaswechsler FHT 770 D der Fa. Friesecke & Höpfner GmbH, Erlangen-Bruck, und den Gamma/Guard 150 der Fa. Tracerlab.

Beide Geräte arbeiten nach folgendem Prinzip:

Durch die Gammastrahlung wird der NaJ-Kristall zur Szintillation angeregt. Die entstehenden Lichtblitze werden von der Photokathode des Photomultipliers in elektrische Impulse umgewandelt und nach Verstärkung als Counts/Zeit ausgedruckt.

Zur Messung von ^{125}J wird der FHT 770 D eingestellt:

Eingangsempfindlichkeit 56 mV

Kanalbreite 50%

Einstellung des Gamma/Guard 150: High Voltage 460 V
Threshold 35 mV
Coarse Gain 64
Fine Gain 1,8.

2.2.2.5. Nachreinigung

Es konnte für beinahe alle Peptid- und Glykoproteinhormone gezeigt werden, daß während der Markierung mit ^{125}J eine gewisse Menge an Hormon ihre chemischen und immunologischen Eigenschaften verändert - man spricht vom sogenannten "damaged-Hormon" (11). Einige der chemisch veränderten Komponenten tendieren zu Aggregation, andere gehen unspezifische Bindungen zu normalen Serumproteinen ein. Da diese Produkte auf der Sephadex G-50-Säule vor dem regulären ^{125}J -hGH eluiert werden (105), ergibt der abfallende Teil des Proteinpeaks einen Tracer, der für Routinezwecke durchaus zufriedenstellend ist. HANSEN (48) berichtet im Gegensatz zu Erfahrungen beim TSH (37), daß er unabhängig vom "damaged-Hormon"-Anteil bei einer normalen Plasmaprobe gleiche Werte messen konnte. Da es sich bei uns, wie später genauer ausgeführt, als notwendig erwies, für die Bestimmungen der Chromatographien höchst reinen Tracer zu verwenden, wurde der Proteinpeak der Sephadex G-50-Säule auf der bereits beschriebenen Sephadex G-75-Säule nachgereinigt. Abbildung 1 (unten) zeigt eine solche Rechromatographie, bei der die ansteigenden Fraktionen des Proteinpeaks schon verworfen worden waren. Der erste Peak, allgemein als "damaged-Hor-

mon" bezeichnet, wird mit dem Leervolumen V_0 eluiert, der zweite Peak, bei dem es sich um markiertes "big hGH" handeln dürfte (siehe 3.1.), bei K_D 0,45. Der dritte und größte radioaktive Peak erscheint bei K_D 0,75 und repräsentiert das markierte reguläre oder "little hGH". Dieser Peak III wird als Tracer verwendet. Das Eluat wird mit 0,05 M Phosphatpuffer + 0,5% Rinderalbumin auf eine Gebrauchskonzentration von 30 000 counts pro 2 Minuten und 100 μ l verdünnt. Zum Tracer wird entsprechend dem im Assay verwendeten 1. Antikörper entweder Normalziegenserum 1:16 000 oder Normalkaninchenserum in einer Konzentration von 0,25% als Ko-Präzipitat zugegeben. Der gebrauchsfertige Tracer wird in 10 ml Fraktionen abgefüllt und eingefroren.

2.2.2.6. "Alterung" des markierten Hormons

Gemäß dem physikalischen Zerfallsgesetz nimmt die Strahlungsintensität des Jodisotops über die Zeit ab. Gleichzeitig ändern sich während der Lagerung des Tracers die physikochemischen und immunologischen Eigenschaften des markierten Hormons (5). Um diese "Alterung" zu erfassen, wurde frisch gelieferter Tracer der Fa. Sorin nach Ankunft sofort über die Sephadex G-75-Säule chromatographiert, weitere Fraktionen davon später nach 7, 10, 14 und 20 Tagen, teils eingefroren, teils bei Zimmertemperatur gelagert, über die Säule gegeben. Abbildung 2 zeigt die prozentuale Verteilung von Peak I = damaged Hormon, Peak III = regulären Tracer und den Salzanteil frisch und nach Lagerung. Peak II erscheint bei dieser Chromatographie nicht, da der industriell hergestellte Tracer vor der Verschickung nachgereinigt und lyophilisiert wurde. So ist auch der relativ geringe damaged-Hormon-Anteil zu Beginn zu verstehen.

Es fällt auf, daß nicht nur der damaged-Hormon-Anteil fortlaufend ansteigt, besonders bei Zimmertemperatur, sondern auch der Salzpeak, d.h. es geht eine ständige Dejodierung vor sich. Der Anteil des reinen Tracers fällt von 75% in 14 Tagen auf

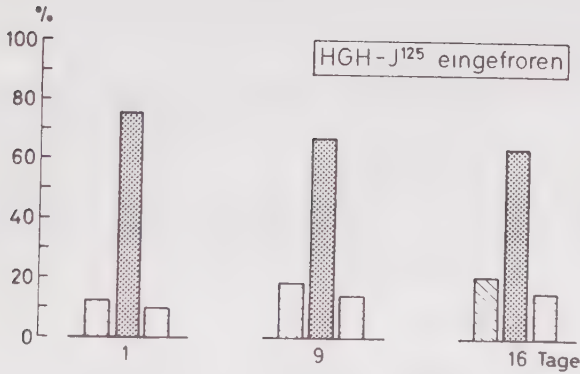
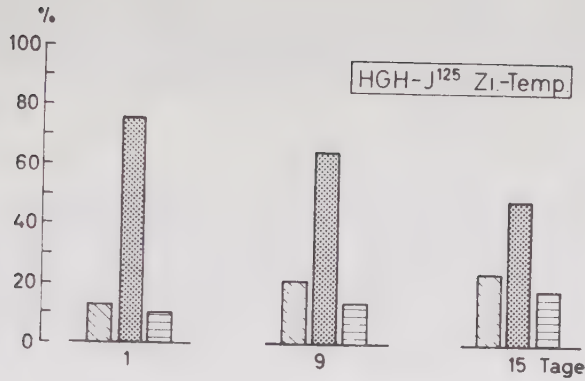


Abb. 2: Alterung des markierten Hormons:

Die prozentuale Verteilung von SORIN-Tracer in Peak I = damaged Hormon, Peak III = regulärer Tracer und Salzanteil ist dargestellt nach Lagerung bei Zimmertemperatur (oben) und in der Kühltruhe bei -18°C (unten).

65% bzw. 58% bei Zimmertemperatur, nach 20 Tagen (hier nicht mehr gezeigt) auch bei tiefgefrorener Lagerung auf unter 50%. Dadurch läßt sich auch verstehen, daß die Bindungsfähigkeit zum Meerschweinchen-Antikörper des SORIN-Kits bei älterem Tracer über die Zeit abnimmt.

2.2.3. Radioimmunoassay

Die radioimmunologische Bestimmung von hGH wurde mit drei verschiedenen Radioimmunoassays durchgeführt: Zuerst mit dem vollständigen Kit der Fa. Sorin, dann bei eigener Markierung mit einem Ziegenantikörper von der Fa. Mann Research und jüngst mit einem in unserem Labor durch Immunisierung von Kaninchen gewonnenen Antikörper (Priv.Do. Dr. v. WERDER). Die Trennung des gebundenen von freiem Hormon erfolgte dabei stets durch Präzipitation des "bound"-Anteils mittels eines spezifischen Antiserums (= 2. Antikörper).

2.2.3.1. Anti-hGH-Antikörper vom Meerschweinchen (SORIN)

Reagenzien:

Als Lösungsmittel für Antikörper, Tracer und Standard, sowie zur Verdünnung der Serumproben dient 0,13 M Boratpuffer, pH 8,4, mit 0,5 g% Rinderalbumin.

Ansatz:

Borsäure, kristall., MG 61,83 (Reagenzien Merck, Nr. 165)	8,00 g
Äthylendinitrilotetraessigsäure-Dinatriumsalz (Dihydrat), Triplex III, MG 372,24 (Reagenzien Merck, Nr. 8418)	7,46 g
Rinderalbumin, trocken, reinst (Behringwerke Marburg)	5,0 g

Mit 2 N Natronlauge wird pH 8,4 eingestellt. Auffüllen mit Aqua bidest. auf 1 Liter.

Mit diesem Puffer werden auch alle Serumproben verdünnt, normalerweise im Verhältnis 1:6, es sei denn, man erwartet bei Akromegalen-Serum oder nach Insulinhypoglykämie höhere Werte. Bei Serumbestimmungen werden deshalb die Standardverdünnungen in 1:6 verdünntem Rinderserum durchgeführt, um ähnliche Proteinverhältnisse wie in den zu bestimmenden Proben zu erhalten. Sollen dagegen Chromatographieproben bestimmt werden, so wird auch die Standardreihe nur in dem beschriebenen Normalpuffer gelöst. Der 1. Antikörper (vom Meerschweinchen), der präzipitierende 2. Antikörper (vom Kaninchen) und das markierte ^{125}J -hGH (elektrolytische Markierungsmethode nach ROSA) werden lyophilisiert geliefert und erst kurz vor Gebrauch in Lösung gebracht.

Standardverdünnungsreihe für die Eichkurve

20 ng Standard-hGH werden in 2 ml Puffer bzw. verdünntem Rinderserum gelöst und ergeben so die höchste Standardkonzentration der Eichkurve : 10 ng/ml = 1.Eichwert, davon ausgehend:

1 ml verdünntes Rinderserum bzw. Normalpuffer		1:6 + 1 ml Standardlösung = 5 ng/ml	
1 ml	"	+ 1 ml	" = 2,5 ng/ml
1 ml	"	+ 1 ml	" = 1,25 ng/ml
1,5 ml	"	+ 1 ml	" = 0,5 ng/ml
1 ml	"	+ 1 ml	" = 0,25 ng/ml
1 ml	"	+ 1 ml	" = 0,125 ng/ml

Bei jeder Bestimmung werden Kontrollseren in festen Verdünnungen mitgeführt, um den "between-assay"-Variationskoeffizient berechnen zu können. Darunter versteht man den Quotienten aus Standardabweichung und Mittelwert.

Um die unspezifische Bindung zu ermitteln, wird der N-Wert bestimmt, bei welchem der spezifische Antikörper fehlt. Der B/B_0 -Quotient läßt sich damit auf den genaueren Wert

$$\frac{B-N}{B_0-N}$$

erweitern.

Der Ansatz folgt nach folgendem Schema:

N	B ₀	S	Ks	P
100 ul	100 ul	jeweils 100 ul der Standardlösung oder der Probe		
1:6 ver- dünntes Rinder- serum	1:6 ver- dünntes Rinder- serum			
100 ul Puffer		100 ul Anti-hGH-Antikörper		

dabei ist: N = unspezifische Bindung
 B₀ = Leerwert = höchste Tracerbindung ohne
 Verdrängung durch kaltes Hormon
 S = Standardverdünnungen
 Ks = Kontrollseren
 P = zu bestimmende Proben

Von B₀ werden neun Werte, von allen anderen Proben werden 3fach-Bestimmungen gemacht. Alle Pipettierschritte werden, soweit möglich, mit dem Probe-Reagenz-Dosierer 5231 der Fa. Eppendorf, Hamburg, durchgeführt; als Reaktionsgefäße dienen Eppendorf-Kunststoffröhrchen.

Zunächst erfolgt eine Vorinkubation des hGH-bindenden Anti-körpers mit dem Standard- bzw. Rinderserum bzw. der zu bestimmenden Probe für 30 Stunden bei Zimmertemperatur. Darauf wird in alle Reaktionsgefäße und drei Röhrchen extra zur Messung der Gesamtaktivität ¹²⁵J-hGH zugegeben und für weitere 18 Stunden inkubiert. Bei jedem Reaktionsschritt werden alle Röhrchen mit dem Vortex-Mixer gemischt. Dabei ist darauf zu achten, daß das Gemisch nicht schäumt und der Deckel nicht benutzt wird. Wenn der 2. Antikörper zugegeben ist, kann nach 6 Stunden die Abtrennung des Präzipitats (= gebundenes Hormon) durch Mikrofiltration über Zelluloseacetatfilter nach BOTTERMANN et al. (14) erfolgen.

Die Filter (= "bound"-Anteil) werden im Gammazähler zwei Minuten lang gezählt.

2.2.3.2. Anti-hGH-Antikörper von der Ziege

Bei diesem Assay dient als Basispuffer 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,5, nach Sörensen + 0,5% Rinderalbumin.

Standard : Creschormon^R, hGH-Präparation nach ROOS (80), Ampulle à 2 mg, lyophilisiert, clinical grade, (Deutsche Kabi GmbH, München), wird auf eine Gebrauchskonzentration von 20 ng/ml mit Assaypuffer verdünnt und in Eppendorfgefäße fraktioniert eingefroren.

1. Antikörper: Anti-human-growth-hormone-Serum von der Ziege (Mann Research Laboratories N.Y., N.Y., Kat.Nr. 1435) wird mit Assaypuffer auf eine Gebrauchskonzentration von 1:50 000 verdünnt und in 10 ml-Fraktionen eingefroren gelagert.

Tracer : ¹²⁵J-hGH, aus eigener Markierung, wie unter 2.2.2.5. beschrieben.

2. Antikörper: Antiziege-Gamma-Globulin-Serum vom Kaninchen, Batch Nr. 2284 X (Behringwerke, Marburg/Lahn), wird auf eine Konzentration von 1:20 verdünnt mit:
0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,5
0,5 % Rinderserumalbumin
0,025 M EDTA
Nach Zugabe von EDTA muß wieder auf pH 7,5 eingestellt werden.

Standardverdünnungen, Ansatz und Inkubationszeiten werden in gleicher Weise wie beim SORIN-Kit durchgeführt.

2.2.3.3. Anti-hGH-Antikörper vom Kaninchen

Als Assaypuffer dient wiederum 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,5, + 0,5% Rinderserumalbumin.

Standard : Creschormon^R (Deutsche Kabi GmbH, München)
wie bereits beschrieben.

Tracer : Markierung (wie beschrieben) einer ROOS-Präparation:
Wachstumshormon reinst von Cabi, Schweden.

1. Antikörper: Im eigenen Labor gewonnenes Anti-hGH-Antiserum
vom Kaninchen, K III. Wird in einer Gebrauchs-
konzentration von 1:100 000 im Assay eingesetzt.

2. Antikörper: Anti-Kaninchen-Gamma-Globulin vom Esel, Lot.
Nr. K 8135 (Wellcome Research Laboratories
Beckenham, England BR 3,3 BS). Wird je nach
Charge zwischen 1:12 und 1:20 verdünnt mit
Assaypuffer + 0,01 M EDTA.

Dank der höheren Sensitivität des Anti-hGH-Antikörpers beginnt
die Standardreihe erst mit 4 ng/ml als 1. Eichwert.

Die weiteren Verdünnungspunkte sind:

2,0; 1,0; 0,5; 0,25; 0,1; 0,05; 0,025 ng/ml.

Das Ansatzschema ist identisch mit den beiden vorherigen Assays.
Inkubiert wird bei + 4° C nach folgendem zeitlichen Schema:

1. Die Vorinkubation mit dem 1. Antikörper beträgt entweder
von Mo-Mi = 2 Tage (kurze Inkubation) oder
von Mo-Fr = 4 Tage (lange Inkubation)
2. Inkubation nach Zugabe von 0,1 ml Tracer
Mi-Do = 1 Tag (kurze Inkubation)
Fr-Mo = 3 Tage (lange Inkubation)
3. Inkubation nach Zugabe von 0,1 ml präzipitierendem Anti-
körper jeweils 1 Tag, danach "free-bound"-Trennung durch
Mikrofiltration.

2.2.3.4. Sensitivität und Spezifität der Bestimmung

Unter der Sensitivität der Bestimmung versteht man die untere Nachweisgrenze, d.h. die geringste Konzentration, die man noch mit statistischer Sicherheit als von null verschieden messen kann. Dieser Wert wird dadurch bestimmt, daß man definitionsgemäß vom Mittelwert des Leerwerts B_0 die dreifache Standardabweichung $3S$ abzieht und daraus den folgenden Quotienten bildet:

$$S = \frac{B_0 - N - 3S}{B_0 - N} \times 100 (\%)$$

Dieser Prozentwert ergibt auf der Eichkurve abgelesen die untere Nachweisgrenze. Sie beträgt für den

SORIN-Antikörper	0,5 ng/ml	≅	50 pg/Ansatz
Ziegen-Antikörper	0,125 ng/ml	≅	12,5 pg/Ansatz
Kaninchen-Antikörper K III	0,025 ng/ml	≅	2,5 pg/Ansatz

Die Spezifität des Antikörpers läßt sich durch Beobachtung der Kreuzreaktion mit anderen ähnlichen Antigenen beurteilen. Nach KABAT (56) versteht man unter Kreuzreaktion die serologische Verwandtschaft verschiedener Einzelantigene, die gleiche oder ähnliche Strukturen im Molekül aufweisen und deshalb mit den Antikörpern gegen jedes andere dieser Antigene reagieren. Die Aminosäuresequenz und die Immunoreaktivität von hGH ist verschieden von anderen Hypophysenhormonen, ausgenommen Prolaktin (hPRL) scheint eine ähnliche Struktur zu haben (31). Sogar noch näher verwandt in biologischer Aktivität, Aminosäuresequenz und Immunoreaktivität ist hPL (= human placental lactogen) (65). So wurde eine Kreuzreaktion von hPL mit hGH-Antikörpern schon früher beschrieben (43, 98). Diese Erfahrung ließ sich sowohl für den Meerschweinchen-Antikörper (SORIN) und den Ziegen-Antikörper (103) als auch für den Kaninchen-Antikörper K III (104) bestätigen. Dagegen zeigte Prolaktin

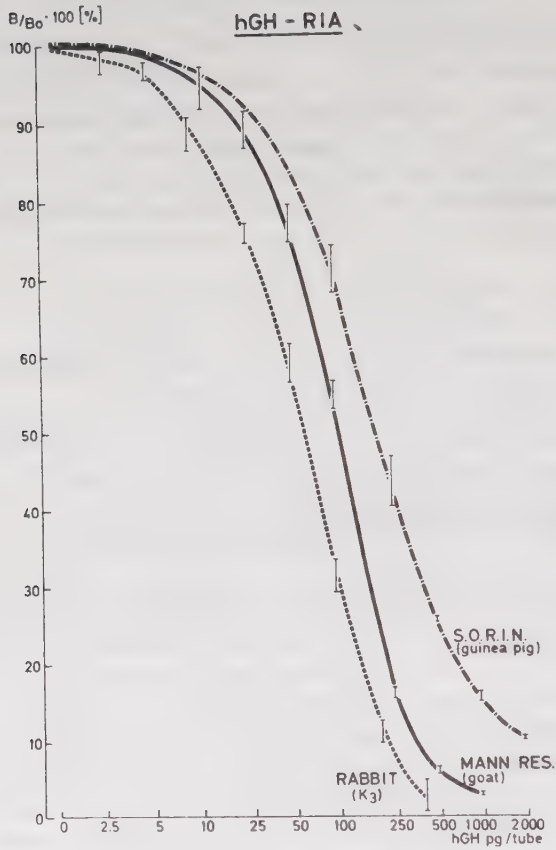


Abb. 3: hGH-RIA-Standardkurven mit den drei verschiedenen Anti-hGH-Antikörpern.
 Die hGH-Konzentration ist logarithmisch in pg/Ansatz aufgetragen (Abszisse), die Bindung in $B/B_0 \times 100 (\%) \pm S.$
 Der empfindlichste Antikörper (AK) ist der Kaninchen-AK (K_3).

bei keinem Antikörper eine Kreuzreaktion, ebenso wie die mitgeprüften LH, FSH und TSH.

Die Präzision der Methode läßt sich durch den Variationskoeffizienten innerhalb eines Tests (= "within assay"-VK) beschreiben. Der Variationskoeffizient (VK) ist definiert als der Quotient aus Standardabweichung und Mittelwert einer mehrfach bestimmten Probe. Vergleicht man die Ergebnisse zwischen verschiedenen Tests (= "between assay"-VK), so läßt sich daraus eine Aussage über die Reproduzierbarkeit einer Methode machen. Sie wird durch Bestimmung eines Kontrollserums in mehreren Verdünnungen über mehrere Ansätze hin geprüft.

Für den am meisten verwendeten Ziegen-Antikörper-Assay fanden wir:

"within assay"-VK : 5% im Meßbereich von 0,5 bis 5 ng/ml

"between assay"-VK:

a) 1:40 Verdünnung : $\bar{x} = 2,42$ ng/ml VK = 7% (N=14)

b) 1:80 Verdünnung : $\bar{x} = 1,21$ ng/ml VK = 8% (N=14)

2.3. Radioimmunologische rGH-Bestimmung

Wegen der begrenzten Sensitivität und der methodischen Schwierigkeiten der Bioassays wurde auch für das Rattenwachstumshormon bald die radioimmunologische Methode eingeführt (72, 88). Wir arbeiten nach der von BIRGE et al. (80) modifizierten Doppelantikörpermethode. Die verwendeten Reagenzien wurden uns dankenswerterweise vom National Institute of Health, Bethesda, USA, durch Dr. PARLOW vom Rat Pituitary Hormone Distribution Program zur Verfügung gestellt.

2.3.1. Reagenzien

- 1.) Hochgereinigtes Rattenwachstumshormon für die Markierung:
NIAMD-Rat GH-I-2, biologische Aktivität =
1,5 Internationale Einheiten pro mg, ungefähr
0,5 mg liegen in lyophilisierter Form vor
- 2.) rGH-Referenzpräparation für den Radioimmunoassay:
NIAMD-Rat GH-RP-1, biologische Aktivität =
0,6 Internationale Einheiten pro mg, 1 g in lyophilisierter Form
- 3.) Spezifischer Antikörper gegen rGH, hergestellt durch Immunisierung von Affen mit rGH-RP-1:
NIAMP-Anti-Rat GH-Serum-1
25 ul Affenserum, unverdünnt, lyophilisiert
- 4.) Unspezifischer präzipitierender Antikörper:
 - a) Anti-Rhesusaffe-Serum vom Kaninchen
Batch Nr. 964 AC, Behringwerke Marburg
 - b) Goat Antibody to Monkey-Gamma-Globulin lyophilized
Lot.Nr. 079518, A grade
Calbiochem, Los Angeles, California 900 54, USA.

2.3.2. Radioaktive Markierung des rGH

2.3.2.1. Jodierung

Die radioaktive Markierung erfolgt nach einer Modifikation der von GREENWOOD et al. (63) angegebenen Methode. Als Markierungsstandard dient das hochgereinigte rGH-I-2, das mit Aqua dest. auf eine Konzentration von 0,2 mg/ml verdünnt wird und in 50 ul Fraktionen abgeteilt bei -18°C gelagert wird.

Vorbereitung:

Na ^{125}J zur Proteinmarkierung, spez. Aktivität 14-18 Ci/mg,
0,5 M Phosphat-Puffer nach Sörensen, pH 7,5,
Chloramin-T-Lösung (25 mg/10 ml)

Sephadex G-50, äquilibriert in 0,07 M Veronalpuffer,
wird in ein Säulenglasrohr (30 x 1 cm) gepackt. Nach Vorgabe von 2 ml 5% Rinderalbuminlösung wird mit Veronalpuffer nachgewaschen, bis das Protein vollständig eluiert ist.

In das konische Reaktionsgefäß werden nacheinander ein-
pipettiert:

- 20 ul Na¹²⁵J (= 500 uCi)
- 40 ul 0,5 M Phosphatpuffer
- 20 ul rGH (= 4 ug)
- 20 ul Chloramin-T-Lösung

Dieses Gemisch wird 30 Sekunden auf einem Vortex-Mixer geschüttelt und nach Zugabe von 200 ul Veronalpuffer auf die Säule übertragen. Pipette und Reaktionsgefäß werden mit weiteren 200 ul Puffer nachgespült, die Waschlösung wird ebenfalls auf die Säule gegeben.

Eluiert wird mit 0,07 M Na-Veronalpuffer. Je 1 ml des Eluats wird in 30 Eppendorfröhrchen aufgefangen und dann die Radioaktivität mit dem Telefunken-Gammazähler gemessen. Die spezifischen Aktivitäten lagen im Bereich von 13,8 bis 78,8 uCi/ug rGH.

Der grundlegende Unterschied zu der hGH-Markierung liegt darin, daß man auf ein direktes Stoppen der von Chloramin T bewirkten Oxydation verzichtet. Während dort Natriummetabisulfit das freie Jod wieder zu Jodid reduziert, wird hier die Markierungsreaktion erst dadurch gestoppt, daß die Reaktionspartner durch verschiedene Molekülgröße auf der Sephadex-Säule schnell getrennt werden.

2.3.2.2. Nachreinigung

Im Gegensatz zur hGH-Markierung, bei der der von der Markierungssäule gewonnene Tracer für Routinebestimmungen durchaus verwendungsfähig ist, muß man nach der rGH-Markierung immer eine Nachreinigung anschließen. Dafür dürfte neben der bei jeder Jodierung vorkommenden "damaged Hormon"-Bildung vor allem die größere Unreinheit der rGH-Präparationen verantwortlich zu machen sein.

Der gesamte Proteinpeak der Markierungssäule - mit Ausnahme der

ersten ansteigenden Fraktion - wird auf der bereits beschriebenen 1,10 m langen Sephadex G-75-Säule rechromatographiert. Wie Abbildung 4 zeigt, findet sich hier ein den Erfahrungen beim hGH analoges Verhalten. Eine relativ hohe Radioaktivität wird im Ausschlußvolumen (= Bereich hoher Molekulargewichte) eluiert, ein kleinerer, dennoch signifikanter Peak zeichnet sich bei K_D 0,4 ab, entsprechend dem hGH-Peak-II-Tracer. Der Hauptpeak wird bei K_D 0,75 eluiert, was einem MG von etwa 22 500 und damit dem regulären oder "little"-rGH entspricht. Dieser Tracer wird auf eine Gebrauchskonzentration von 10 000 counts/min und in 10 ml Fraktionen bei -18°C aufbewahrt.

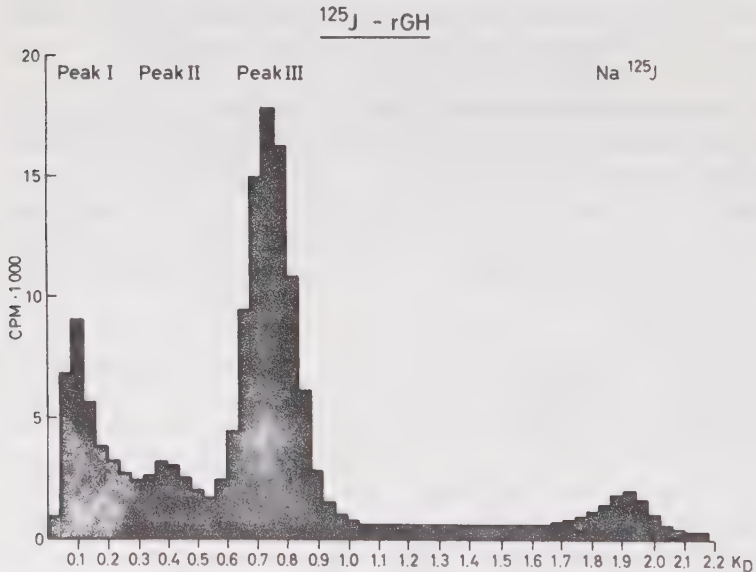


Abb. 4: Nach Markierung des rGH und Abtrennung des $\text{Na } ^{125}\text{J}$ vom ^{125}J -markierten Protein auf einer Sephadex G-50-Säule erfolgte die Rechromatographie des markierten Proteins auf einer Sephadex G-75-Säule (3 x 110 cm). Der Hauptpeak, der bei K_D 0,8 eluiert wird, stellt das gereinigte ^{125}J -rGH dar und wird als Tracer in den Radioimmunoassay eingesetzt.

2.3.3. Radioimmunoassay

Diese Doppelantikörpermethode wird ohne die meist übliche Vorinkubation mit anschließender Tracerinkubation durchgeführt. Alle Reaktionspartner, mit Ausnahme des präzipitierenden Antikörpers, werden gleichzeitig angesetzt. Für alle Verdünnungen wird der gleiche Assaypuffer verwendet:

- O,05 M Phosphatpuffer nach Sörensen, pH 7,5
- + 0,5% Rinderserumalbumin
- + 0,025 M EDTA.

Antikörperverdünnung:

NIAMD-Anti-Rat-GH-Serum-1 wird in 50 ul Aqua dest. gelöst und mit Assaypuffer auf 1:40 000 verdünnt. Davon gelangen 100 ul in den Assay.

Anti-Rhesus-Affen-Serum (Behring) wird in einer Verdünnung von 1:32, bzw. Goat Antibody (Calbiochem) 1:4 verdünnt eingesetzt.

Standardverdünnung:

Als Standard für den Radioimmunoassay dient die Referenzpräparation rGH-RP-1, die auf eine Konzentration von 500 ng/ml = 1. Eichpunkt verdünnt wird. Weitere Eichpunkte sind 250; 100; 50; 25; 10 ng/ml.

Daraus ergibt sich folgendes Ansatzschema:

(Volumina der Reaktionspartner in ml)

	rGH- Stand.	PO ₄ - Puffer	Probe	1. AK	¹²⁵ J- rGH	2. AK
T	-	-	-	-	0,1	-
N	-	0,5	-	-	0,1	0,1
B _O	-	0,4	-	0,1	0,1	0,1
S	0,1	0,3	-	0,1	0,1	0,1
P	-	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1

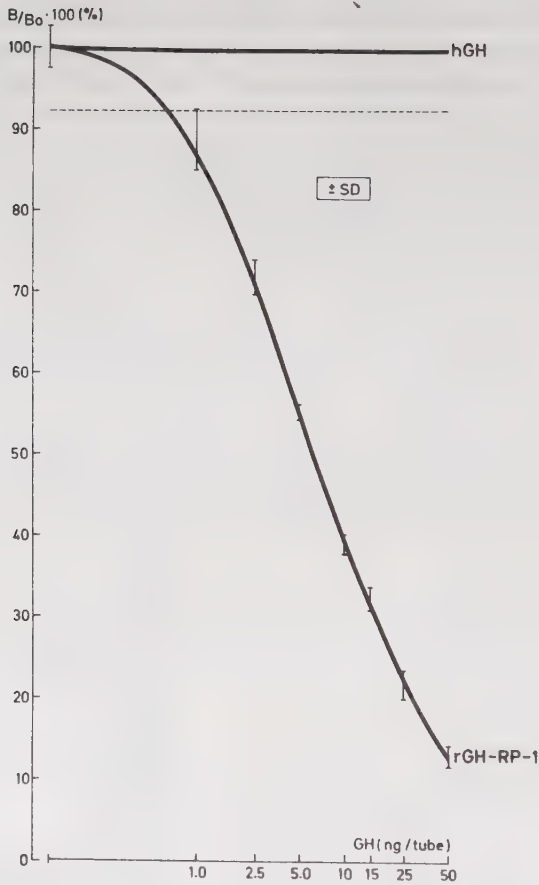


Abb. 5: rGH-Standardkurve für die Referenzpräparation rGH-RP-1. Die rGH-Konzentration ist logarithmisch in ng/Ansatz angegeben. Die Kurve wurde nach dem Spline-Approximationsverfahren (67) erstellt. hGH zeigt keine Kreuzreaktion mit dem rGH-Antikörper. Die gestrichelte Linie gibt die untere Nachweisgrenze an ($B_0 - 3S$).

Dabei bedeutet: T = Gesamtaktivität
N = unspezifische Präzipitation
B₀ = Leerwert
S = Standardproben
P = Serumproben

Das angesetzte Reaktionsgemisch wird im Kühlraum bei + 4° C zuerst für 3 Tage, nach Zugabe des präzipitierenden Antiserums noch weitere 24 Stunden inkubiert. Alle Reaktionsgefäße werden dann für 30 Minuten auf 1000 g zentrifugiert und der Überstand wird mit einer Absaugvorrichtung (Dr. SCHWAB, SFB 51) entfernt. Die Plastikröhrchen, die jetzt nur noch den abzentrifugierten "bound"-Anteil der Radioaktivität enthalten, werden im Gamma-counter gezählt. Die Ergebnisse lassen sich nach bereits beschriebener Weise auswerten. Abbildung 5 zeigt eine solche typische Standardkurve. Die untere Nachweisgrenze liegt dabei bei 10 ng/ml. Menschliches Wachstumshormon zeigt, wie ebenfalls eingezeichnet, keine Kreuzreaktion mit dem Affen-Antikörper. Das Gleiche gilt für Ratten-FSH, -LH und -TSH, während für das Rattenprolaktin vom NIAMD eine geringe Kreuzreaktion von 1,6% angegeben wird.

2.4. Insulinhypoglykämie-Test (IHT)

Der Insulinhypoglykämie-Test dient als Provokationstest für hGH und ACTH bei der Hypophysenvorderlappen-Diagnostik (84). Wie ROTH et al. (85) nachweisen konnten, wirkt jedoch ausschließlich die von Insulin hervorgerufene Hypoglykämie und nicht Insulin an sich als Stimulus für die vermehrte hGH-Inkretion. Der Test wird am nüchternen Patienten unter Grundumsatzbedingungen wie bei GREENWOOD et al. (44) angegeben durchgeführt. Folgendes Schema wurde dabei angewandt: Zunächst wird ein Nüchternwert-Blut (- 15 min) abgenommen und die Cubitalvene mit physiologischer Kochsalzlösung offengehalten. Nach 15 Minuten wird der 2. Nüchternwert (0 min) abgenommen und sofort 0,15 E

Altinsulin pro kg Körpergewicht intravenös injiziert. Jeweils 30, 45, 60 und 90 Minuten nach der Insulininjektion erfolgt eine Blutentnahme aus der noch liegenden Kanüle. Zur Blutzuckerbestimmung werden bei jeder Probe 50 ul Blut in 500 ul 0,33 N Perchlorsäure enteiweißt.

Die Validität der Stimulation wird durch den Abfall des Blutzuckers unter 40 mg% oder durch die klinisch manifesten Stresssymptome dokumentiert.

3. ERGEBNISSE

3.1. Untersuchungen über menschliches Wachstumshormon

3.1.1. Chromatographische Auftrennung von ^{125}J -markierten Tracern über die Sephadex G-75 Säule

3.1.1.1. ^{125}J -hGH, ^{125}J -TSH, ^{125}J -Insulin

Um die Trennfähigkeit der Sephadex G-75 Säule einfach testen zu können, bot sich primär die Chromatographie von leicht meßbarem, radioaktiv markiertem hGH-Tracer an. Der von der Markierungssäule gewonnene Proteinpeak ließ sich dabei in vier eindeutig abgrenzbare Peaks auftrennen, die sich nach jeder Markierung fanden. Abbildung 6 zeigt ein solches typisches Elutionsprofil. Der erste Peak (Peak I) wird mit dem Leervolumen eluiert, ein kleinerer läßt sich bei K_D 0,45 (Peak II) abgrenzen und die höchste Radioaktivität wird bei K_D 0,80 (Peak III) gemessen, was das markierte reguläre hGH repräsentiert. Der letzte Peak bei K_D 2,20 läßt sich als Salzpeak identifizieren. Einen Anhalt für die Molekulargewichtsgrößenordnungen mag Albumin ($M_G = 69\ 000$) geben, dessen Gipfel zwischen Peak I und Peak II bei K_D 0,25 - 0,30 erscheint. Die prozentuale Verteilung der Radioaktivität beträgt in diesem Fall 22% : 10% : 68%, wobei der Salzpeak vernachlässigbar klein ist, wenn die Chromatographie unmittelbar nach der Markierung erfolgt; die spezifische Aktivität war $44\ \mu\text{Ci}^{125}\text{J} / \mu\text{g hGH}$.

Während die Lage der 3 Peaks in der K_D -Skala nach jeder Markierung genau dieselbe war, schwankte ihre Größenordnung erheblich. Tabelle 1 zeigt die prozentuale Verteilung von 8 rechromatographierten Markierungen in Relation zur spezifischen Aktivität. Es findet sich dabei keinerlei Abhängigkeit; es fällt lediglich auf, daß der Anteil von Peak II mit $8\% \pm 1,6\%$ (SD) ziemlich konstant bleibt.

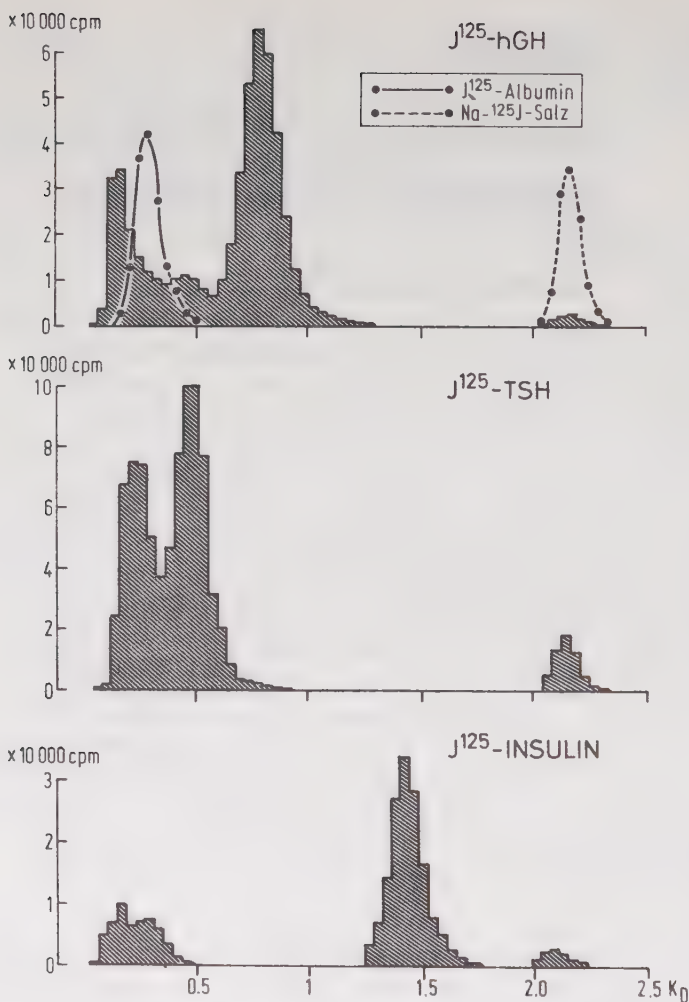


Abb. 6: Chromatographie der ^{125}J -markierten Peptidhormone hGH, TSH und Insulin. ^{125}J -hGH läßt sich in drei signifikante Peaks auftrennen, ^{125}J -TSH und ^{125}J -Insulin in je 2 Peaks. Als Kontrollwerte dienten ^{125}J -Albumin und $\text{Na-}^{125}\text{J}$.

Tab. 1: Verteilung der Radioaktivität nach Chromatographie von ^{125}J -hGH auf der Sephadex G-75 Säule in Abhängigkeit von der spezifischen Aktivität der Markierung.

Spezifische Aktivität ($\mu\text{Ci } ^{125}\text{J}$ / $\mu\text{g hGH}$)	Peak I (K_D 0,18)	Peak II (K_D 0,45)	Peak III (K_D 0,8)
15	36 %	8 %	56 %
23	22 %	9 %	69 %
27	19 %	7 %	74 %
33	40 %	10 %	50 %
41	77 %	7 %	16 %
44	22 %	10 %	68 %
45	75 %	5 %	20 %
46	12 %	8 %	80 %
Mittelwert $\pm$ SD	37,8 $\pm$ 25,2 %	8 $\pm$ 1,6 %	54 $\pm$ 44,9 %

Der "damaged" Hormon-Anteil = Peak I verringert sich natürlich, wenn man den ansteigenden Teil des Proteinpeaks, wie es in Abbildung 1 dargestellt ist, weglässt.

Zum Vergleich wurden TSH- und Insulin-Tracer über die Sephadex G-75 Säule rechromatographiert. Dabei zeigt ^{125}J -TSH eine unterschiedliche Verteilung, je nachdem, ob der ansteigende oder abfallende Teil des Proteinpeaks aus der Markierungssäule verwendet wird. In Abbildung 6 ist das Elutionsprofil des ansteigenden Teils einer frischen Markierung aufgezeichnet, für den der relativ hohe Anteil des ersten Peaks typisch ist. Wenn man ein Molekulargewicht von 28 500 annimmt, entspricht der zweite Peak (K_D 0,5), der zwischen Albumin und dem regulären ^{125}J -hGH liegt, dem eigentlichen TSH. Bei der Rechromatographie beider Einzelkomponenten war keine Umwandlung ineinander oder sonstige Verteilungsänderung festzustellen. Jedoch zeigt der erste Peak im Radioimmunoassay eine deutlich geringere Antikörperbindung.

^{125}J -Insulin (aus dem Kit der Fa. Amersham, Buckinghamshire, England) wird entsprechend seinem relativ geringen Molekulargewicht von etwa 6000 spät bei K_D 1,5 eluiert. Der vordere Anteil dürfte, da es sich um etwas älteren Tracer handelte, "damaged hormone" sein, was aggregierte oder an Albumin gebunden wurde.

3.1.1.2. Rechromatographie der einzelnen ^{125}J -hGH Peaks

Zur weiteren Charakterisierung wurden die durch Chromatographie von ^{125}J -markiertem hGH getrennten Peaks jeweils einzeln rechromatographiert (Abbildung 7). Dabei wird Peak I unverändert wieder an gleicher Stelle eluiert, ebenso Peak II, dessen geringer Anteil an den beiden anderen Komponenten durch die unzureichende Trennungsmöglichkeit zu erklären ist - Peak II liegt im Tal zwischen den zwei anderen recht hohen Gipfeln.

^{125}J -hGH-Rechromatographie

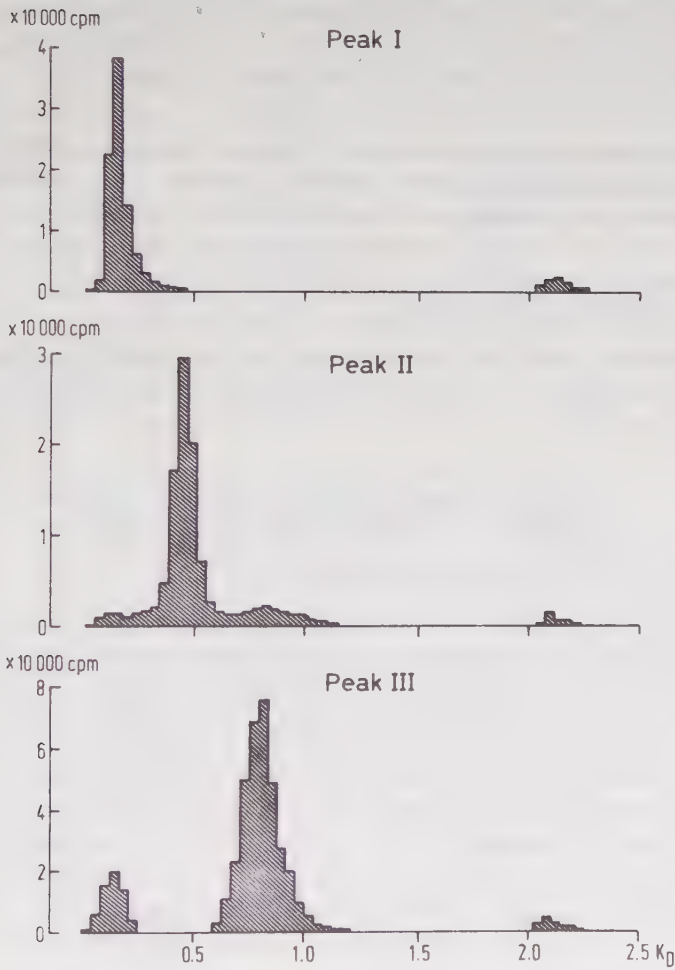


Abb. 7: Rechromatographie der 3 durch Gelfiltration ermittelten ^{125}J -hGH Einzelkomponenten. Peak I- und Peak II-Tracer erweisen sich als stabil, während nach Rechromatographie von Peak III-Tracer ein Teil der Radioaktivität im Ausschlußvolumen gemessen wird.

Hingegen wird bei der Rechromatographie von Peak III 20% der Radioaktivität im Ausschlußvolumen (K_D 0,18) wiedergefunden, 80% bleiben unverändert. Nach Gefriertrocknung war die Umwandlung auf das Doppelte gestiegen, während der 1. Peak dadurch nicht beeinflusst wurde.

Zur Frage der Eiweißbindung wurde ^{125}J -hGH und insbesondere nach Gelfiltration isolierter Peak III jeweils mit 5% Albumin-Pufferlösung oder Serum von Normalpersonen eine Stunde bei 37°C inkubiert und dann rechromatographiert. Dabei konnte keine signifikante Änderung beobachtet werden, die auf Eiweißbindung hindeuten könnte.

Peak I-Tracer wurde bei der Gelfiltration über eine 1 m hohe Sephadex G-200 Säule ebenfalls als homogener Peak im Ausschlußvolumen eluiert.

3.1.2. Gelfiltration von exogenem und endogenem "kaltem" (= unmarkiertem) Wachstumshormon

3.1.2.1. Hypophysenpräparationen

Eine Hypophysenpräparation nach ROOS (80) und eine Leichenhypophyse wurden untersucht. Das im Radioimmunoassay als Standard eingesetzt Creschormon^R, Deutsche Kabi GmbH, München, wurde auf eine Konzentration von $40\text{ }\mu\text{g/ml}$ verdünnt und davon $1\text{ ml} = 40\text{ }\mu\text{g}$ auf die Säule übertragen. Alle Fraktionen wurden im hGH-RIA gemessen. Dabei fand sich eine Auftrennung der hGH-Immunoreaktivität in 3 Peaks, die mit den bei ^{125}J -hGH gefundenen lageidentisch waren. Im Vergleich dazu war jedoch der Anteil der im Ausschlußvolumen gemessenen hGH-Aktivität mit nur 2% bedeutend geringer, während bei K_D 0,45 12% und bei K_D 0,8 mit 86% der Hauptanteil eluiert wurde (Abbildung 8). Entsprechend der in der Literatur gebräuchlichen Terminologie (68, 114) bezeichneten wir die 3 chromatographisch getrennten hGH-Fraktionen als "big-big" hGH (K_D 0,18), "big" hGH (K_D 0,45) und das reguläre Wachstumshormon (MG 21500) als "little" hGH (K_D 0,8). Die Homogenität

der big und little Fraktion wurde durch eine Rechromatographie der beiden Einzelkomponenten geprüft (Abbildung 8). Dabei zeigte sich, daß die big Fraktion nicht völlig rein war, denn 3% wurden im big-big Bereich und 7% im little Bereich gefunden, während 90% wieder bei K_D 0,45 eluierte; die Gesamtwiederfindequote war 88%. Eine nach vierwöchiger Lagerung bei -18°C angeschlossene Rechromatographie erbrachte dasselbe Ergebnis und bestätigte so die Stabilität des big Anteils.

Die little Fraktion wurde mit 96% beinahe vollständig an gleicher Stelle wiedereluiert; daran änderte sich auch nach vierwöchiger Lagerung in der Kühltruhe (-18°C) nichts. Die Wiederfinderaten betrugen dabei jeweils 86% bzw. 95% der aufgetragenen Menge.

Eine frisch entnommene Leichenhypophyse (Pathologisches Institut der Universität München) wurde in 10 ml 0,05 M Phosphatpuffer homogenisiert; nach scharfem Abzentrifugieren wurden 0,5 ml vom Überstand über die Sephadex G-75 Säule chromatographiert. In Abbildung 9 ist das davon erhaltene Elutionsdiagramm aufgezeichnet. Im big-big Bereich wurden $19,14\text{ }\mu\text{g}$ (8,8%) eluiert, im big Bereich etwas verschmiert $44,64\text{ }\mu\text{g}$ (20,6%) und als little hGH $151,97\text{ }\mu\text{g}$ (70,6%). Von den aufgetragenen $250\text{ }\mu\text{g}$ wurden 86,2% wiedergefunden.

Der radioimmunologisch bestimmte Wachstumshormongehalt der Hypophyse betrug 5,02 mg, wenn man die im steilsten Bereich der Standardkurve abgelesenen Werte allein berücksichtigt. Im flacheren Teilstück der Kurve konnte man deutlich höhere Werte ablesen, was schon bei den Verdünnungsreihen der 90-Minuten-Werte bei IHT zu beobachten war.

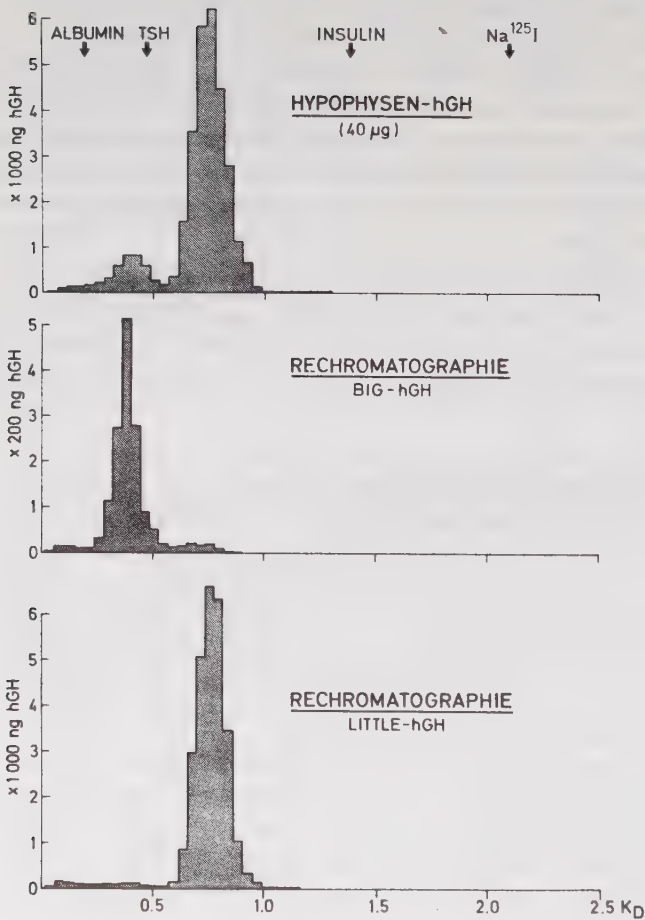


Abb. 8: Chromatographie und Rechromatographie von 40 µg hGH-Hypophysenpräparation (ROOS). Die Pfeile markieren die Elutionsvolumina verschiedener Vergleichssubstanzen. Nach Rechromatographie werden big hGH und little hGH als jeweils ein Peak von der Säule eluiert. Eine Umwandlung von big in little oder umgekehrt findet nicht statt.

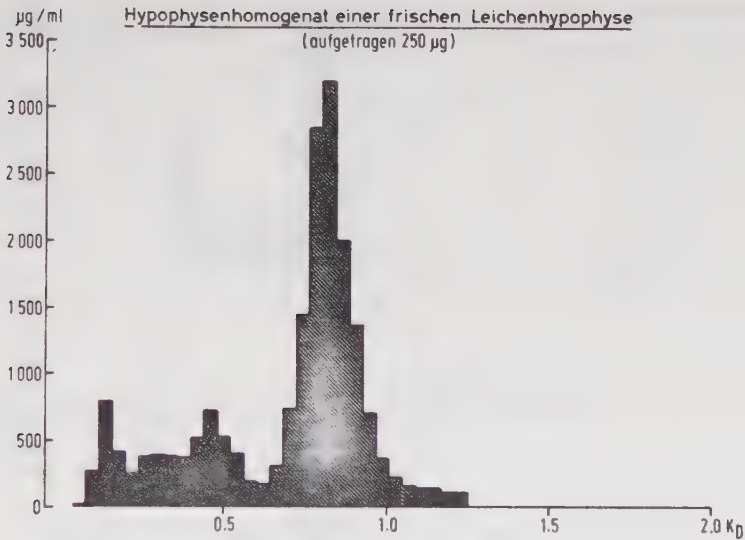


Abb. 9: Gelchromatographie von Hypophysen-hGH.
Vom Homogenat einer frisch entnommenen Leichenhypophyse wurden 250 μg auf die Säule aufgetragen.

Tab. 2: Verdünnungsreihen von Hypophysen-hGH (Homogenat einer frisch entnommenen Leichenhypophyse).

Verdünnungen	abgelesene Konzentration ng/ml	Gesamtgehalt mg/Hypophyse
1 : 80 000	10,0	8,0
1 : 160 000	3,9	6,24
1 : 250 000	2,0	5,0
1 : 320 000	1,52	4,86
1 : 500 000	1,02	5,1
1 : 640 000	0,79	5,06
1 : 1 000 000	0,51	5,1

3.1.2.2. Serum-hGH von Patienten mit aktiver Akromegalie

Die Gelfiltration von Serum-hGH einer Patientin mit aktiver Akromegalie und extrem erhöhtem Wachstumshormonspiegel (3100 ng/ml) zeigte ebenfalls eine Auftrennung in die drei bekannten Peaks mit einer prozentualen Verteilung von 1,1% : 9,6% : 89,3%. In Abbildung 9 sind die Elutionsprofile von ^{125}J -hGH, exogenem Hypophysenhormon und endogenem Serum-hGH bei Akromegalie gegenübergestellt.

Die Seren von sechs akromegalen Patienten, deren hGH-Spiegel von 52,8 bis zu den erwähnten 3100 ng/ml reichten, enthielten im Mittel $1,45\% \pm 0,68\%$ ($\pm$ SD) big-big hGH, $10,3\% \pm 2,2\%$ big hGH und $88,3\% \pm 2,2\%$ little hGH (Tab. 3).

Das bei Akromegalie vermehrt sezernierte Wachstumshormon findet sich also in bemerkenswert konstanter Zusammensetzung, die praktisch identisch ist mit der der Standardpräparation im Serum. Seine Verdünnungen zeigen deshalb auch keine Abweichung von der Standardkurve.

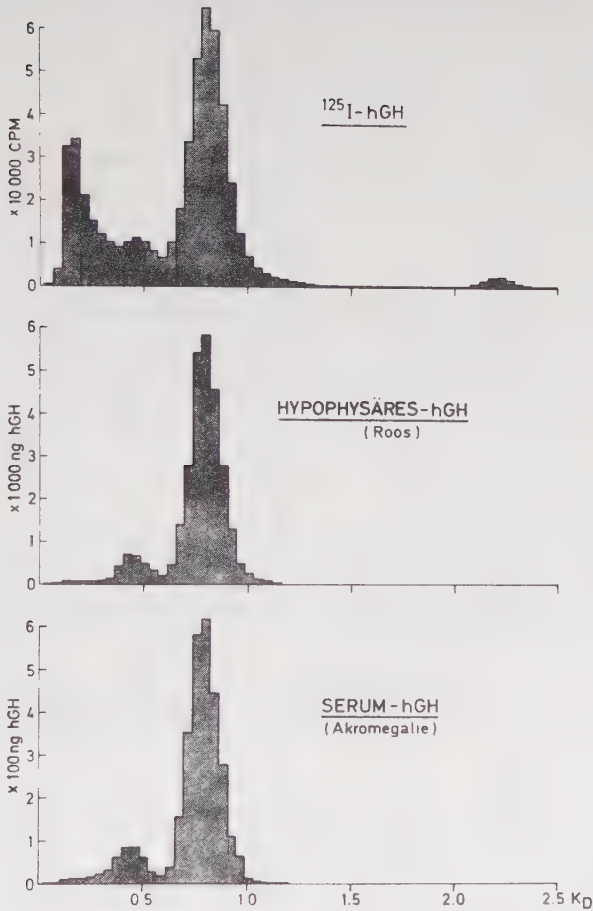


Abb. 10: Chromatographie von ^{125}I -hGH, hGH-Hypophysenpräparation nach ROOS und Serum hGH einer akromegalen Patientin. Die im Ausschlußvolumen gefundene Immunoaktivität ist gering im Vergleich mit der dort gemessenen Radioaktivität (Peak I). Die beiden anderen Peaks entsprechen einander in Höhe und Lage.

Tab. 3: Fraktionierung von Serum-hGH in big-big , big und little hGH mit Sephadex G-75 Säulenchromatographie bei sechs Patienten mit aktiver Akromegalie.

Patient	hGH (ng/ml)	big-big hGH (%)	big-big hGH (ng/ml)	big hGH (%)	big hGH (ng/ml)	little hGH (%)	little hGH (ng/ml)
K.F.	52,8	1	0,5	12,7	6,7	86,3	45,6
A.Sch.	53	2,1	1,1	6,5	3,4	91,4	48,4
K.K.	110	0,5	0,5	10,1	11,1	89,4	98,4
A.F.	270	2,2	5,9	12	32,4	85,8	231,6
G.L.	350	1,8	6,3	10,9	38,2	87,3	305,4
M.D.	3100	1,1	34,1	9,6	297,6	89,3	2768,3
Mittel- wert		1,45		10,3		88,25	
$\pm$ SD		$\pm$ 0,68		$\pm$ 2,18		$\pm$ 2,15	

3.1.2.3. 90-Minuten-Wert nach Insulinhypoglykämie bei Normalpersonen

Das typische Elutionsprofil der hGH-Immunoreaktivität im 90-Minuten-Wert von Insulinhypoglykämietesten ist in Abb. 11 dem von Akromegalen-Serum gegenübergestellt. Im Gegensatz zu diesem findet sich ein signifikant höherer big-big und big Anteil.

Tab. 4: Gelfiltration von Serum-hGH
(90-Minuten-Wert bei IHT)

Patient	hGH ng/ml	big-big hGH %	big-big hGH ng/ml	big hGH %	big hGH ng/ml	little hGH %	little hGH ng/ml
F.Sch.	21,6	14,0	3,0	24,0	5,2	62,0	13,4
E.K.	81,0	4,1	3,3	30,0	24,3	65,9	53,4

Fortlaufende Verdünnungen dieser Seren bilden keine Gerade, d.h. liegen nicht parallel zur Standardkurve und zeigen so ein vom Standard unterschiedliches immunreaktives Verhalten.

Tab. 5: Verdünnungsreihen von Serum-hGH
(90-Minuten-Wert bei IHT)

<u>Verdünnungen</u>	<u>1:10</u>	<u>1:20</u>	<u>1:40</u>	<u>1:80</u>	<u>1:160</u>	<u>1:320</u>
hGH gemessen	10,0	4,85	2,25	1,0	0,51	0,24
hGH berechnet	8,16	4,08	2,04	1,02	0,51	0,25

<u>Verdünnungen</u>	<u>1:4</u>	<u>1:8</u>	<u>1:16</u>	<u>1:32</u>	<u>1:64</u>
hGH gemessen	10,0	3,8	1,35	0,65	0,30
hGH berechnet	5,4	2,70	1,35	0,67	0,34

Die übrigen Werte des Insulinhypoglykämietestes verlaufen wie die Akromegalenserum parallel zur Standardkurve.

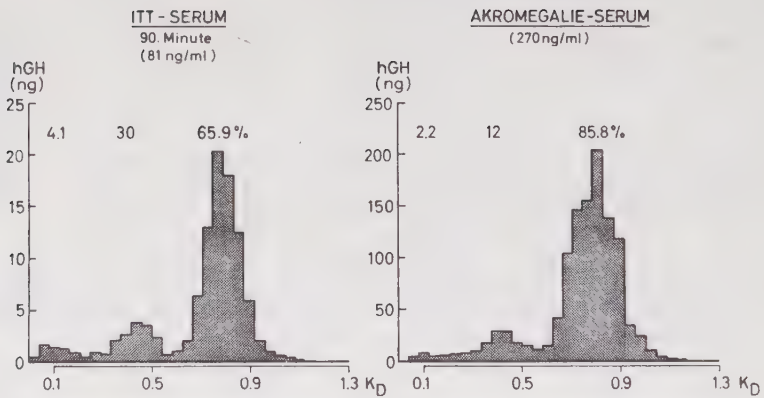


Abb. 11: Gelchromatographie von Serum-hGH.
Links: 90-Minuten-Wert nach Insulinhypoglykämie
bei einem endokrinologisch gesunden Patienten.
Rechts: Serum eines Patienten mit aktiver Akromegalie.

3.1.3. Immunoreaktives Verhalten der durch Gelfiltration getrennten 3 hGH-Komponenten big-big, big und little.

3.1.3.1. Verdünnungsreihen von big-big, big und little hGH

Die durch Gelfiltration getrennten 3 hGH-Fraktionen big-big, big und little wurden in bestimmten Verdünnungen in zwei Radioimmunoassays mit verschiedenem Antikörper (Meerschweinchen- bzw. Ziegen-Antikörper) eingesetzt und ihre Konzentration an den Standardkurven abgelesen, die mit der NIH-hGH-Präparation (HS/394) und dem jeweiligen Antikörper erzielt worden war. Als Tracer wurde der abfallende Teil des von der Markierungssäule erhaltenen Proteinpeaks verwendet.

In Abbildung 12 sind die so gemessenen Werte gegen die berechneten Konzentrationen aufgetragen. Als Ausgangspunkt für die Berechnung wurde ein Wert im steilsten Bereich der Standardkurve zwischen 1,0 und 1,25 ng/ml ausgewählt. Die für das little hGH gemessenen Konzentrationen waren identisch mit den berechneten Werten. Die Verdünnungsreihe des bei K_D 0,45 eluierten big-hGH zeigte dagegen eine Abweichung von der Standardkurve, was sich in der Diskrepanz zwischen berechneten und gemessenen hGH-Konzentrationen in den verschiedenen Verdünnungen ausdrückt. Noch ausgeprägter fand sich dies für das mit dem Leervolumen eluierte big-big hGH. Beide höher-molekulare hGH-Fraktionen verhalten sich also immunoreaktiv unterschiedlich zum Standard-hGH, während little hGH keine Abweichung zeigt.

3.1.3.2. Radioimmunoassay mit Peak I, Peak II und Peak III-¹²⁵J-hGH und big-big, big und little hGH

Mit dem bereits beschriebenen Ziegen-Antikörper-System wurden Radioimmunoassays bei verschiedenen Tracern und Standards durchgeführt. Als Tracer dienten die drei Peaks, die sich bei der Gelfiltration von frisch markiertem ¹²⁵J-hGH über die Sephadex G-75 Säule abtrennten, nämlich Peak I (K_D 0,18), Peak II (K_D 0,45) und Peak III (K_D 0,80) - als Standards wurden

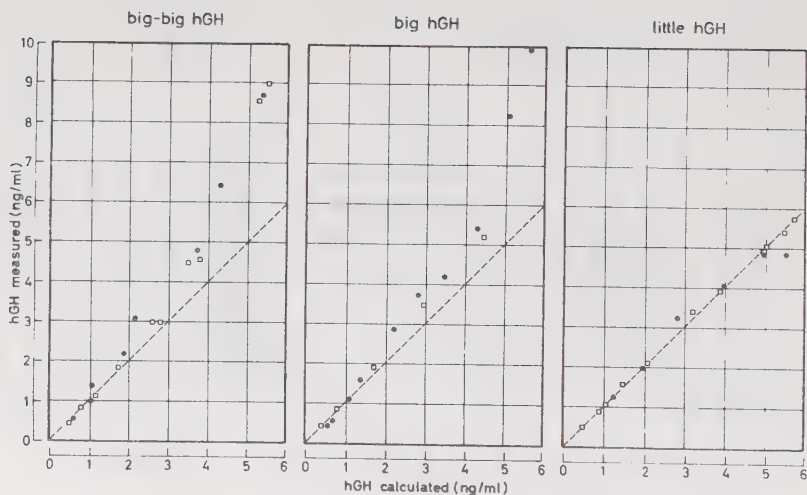


Abb. 12: Verdünnungsreihen von big-big , big und little hGH, aufgezeichnet als gemessene Werte (measured) gegen die berechneten (calculated). Ausgangspunkt der Berechnung ist jeweils ein Wert zwischen 1,0 und 1,25 ng/ml im steilsten Bereich der Kurve. Zwei verschiedene Antikörper wurden verwendet: Anti-hGH-Serum von der Ziege (o) und vom Meerschweinchen (□).

die über die gleiche Säule aufgetrennten big-big, big und little Fraktionen einer ROOS-Hypophysenpräparation eingesetzt (siehe auch Abbildung 10). Ihre Konzentrationen konnten an einer gleichzeitig mitlaufenden normalen Standardkurve (ROOS-Standard + Peak III-Tracer) abgelesen werden, so daß sich für die drei hGH-Fraktionen folgende eingesetzte Konzentrationen ergaben:

big-big hGH:	0,20	0,40	1,00	2,00	4,00	8,00	16,00 ng/ml
big hGH :	0,21	0,42	0,85	1,70	3,40	6,80	13,60 ng/ml
little hGH :	0,12	0,24	0,60	1,20	2,40	4,80	9,60 ng/ml

Zeichnet man diese bekannten Konzentrationen gegen die gemessenen B/B_0 -Quotienten auf, so erhält man für jeden Tracer 3 Standardkurven entsprechend den 3 verwendeten Standards big-big, big und little (Abb. 13).

Peak I-Tracer wird nur durch sein ebenfalls im Ausschlußvolumen eluiertes, nicht jodiertes Äquivalent, big-big hGH, aus seiner Antikörperbindung verdrängt, während big und little hGH keine signifikante Verdrängung vermögen; der 50%-Intercept liegt bei 10,2 ng/ml. Peak II-Tracer erbringt mit jeder Standardfraktion signifikante Verdrängungskurven, die steilste bei einem 50%-Intercept von 2,0 ng/ml jedoch wieder mit big-big hGH. Der 50%-Intercept für big hGH liegt bei 2,2 ng/ml und für little hGH nur bei 2,95 ng/ml. Nur wenn Peak III-Tracer, der höchst gereinigtes ^{125}J -hGH darstellt, eingesetzt wird, fallen die Verdrängungskurven aller 3 Komponenten zusammen; der 50%-Intercept liegt jeweils bei 1,25 ng/ml.

In Abbildung 14 sind die gleichen Ergebnisse gegen B/T (bound/total = gebundene Aktivität / eingesetzte Gesamtaktivität) aufgetragen. Peak I-Tracer, der von allen Standards am wenigsten verdrängt wird, hat mit einer Bindungskapazität von 52,5% die höchste Affinität zum Ziegen-Antikörper, während Peak III-Tracer, der sich am besten verdrängen läßt und somit die steilsten und empfindlichsten Standardkurven liefert, nur insgesamt zu 39,9% gebunden wird. Peak II-Tracer liegt mit einer Bindungs-

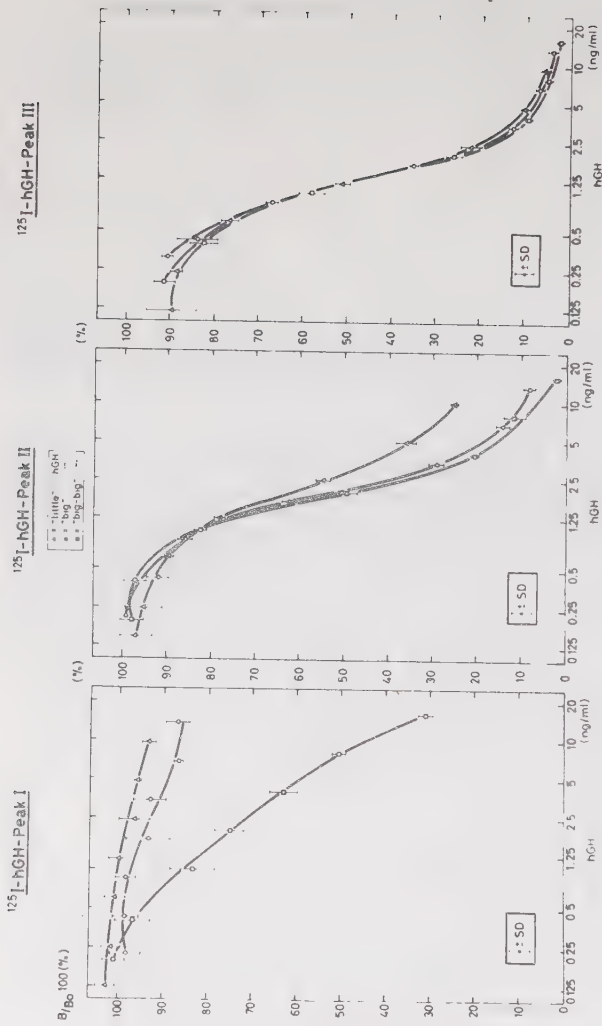


Abb. 13: Standardkurven von big-big₂₅ (□—□), big (○—○) und little (△—△) hGH mit den 3 verschiedenen J-hGH-Tracern. Nur wenn Peak III-Tracer verwendet wird, fallen die Verdrängungskurven der 3 hGH-Fractionen zusammen.

HGH - STANDARD CURVE

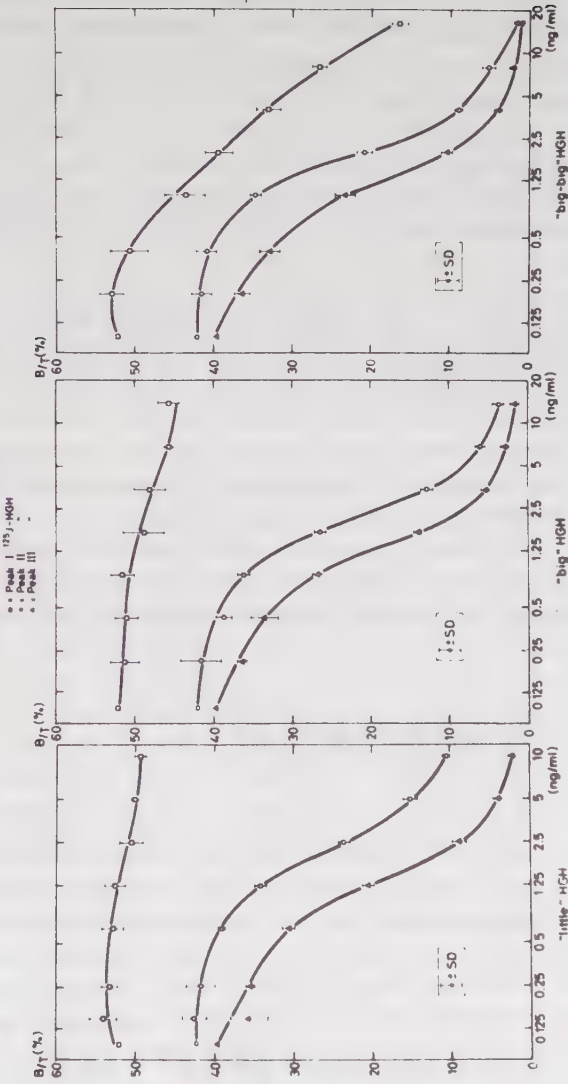


Abb. 14: Standardkurven von Peak I (○—○), Peak II (△—△) und Peak III (△—△) 125 J-HGH mit den 3 Standardfraktionen big-big, big und little. Die Standardkonzentrationen sind gegen B/T (= gebundene/eingesetzte Gesamtaktivität) aufgetragen.

kapazität von 42,1% dazwischen. Umgekehrt betrachtet besitzt big-big hGH die größte Tracerverdrängungsfähigkeit, little hGH die geringste und big hGH liegt in der Mitte.

Das Verhalten des normalen, ungetrennten Standard-hGH resultiert aus der prozentualen Verteilung seiner drei Fraktionen (2% big-big, 12% big, 86% little). Er wird Peak I-Tracer wenig verdrängen können, Peak III-Tracer am stärksten. In einem Versuch mit ^{125}J -hGH vor und den drei Peaks nach Chromatographie ergaben sich so für den 10 ng/ml Standard folgende Werte:

Auf die B/B_0 -Skala bezogen, verdrängte der 10 ng/ml Standardwert den Peak I-Tracer auf $82,1\% \pm 1,8\%$, den Peak II-Tracer auf $24,3\% \pm 1\%$, den ungetrennten Tracer auf $18,5\% \pm 0,5\%$ und den Peak III-Tracer auf $5\% \pm 1,4\%$.

Ein entsprechendes Verhalten ließ sich bei den gleichen Versuchen mit dem Meerschweinchen-Antikörper (Fa. Sorin) feststellen. Peak I-Tracer wurde wiederum an schlechtesten verdrängt, erreichte aber nur eine Gesamtbindung von 20% B/T, während Peak III-Tracer maximal zu 58% gebunden wurde und trotzdem die besten Verdrängungskurven erzielte.

3.1.4. Stabilität und Homogenität von big und little hGH

3.1.4.1. Behandlung von big hGH mit Guanidiniumchlorid

Die Stabilität der big hGH-Fraktion in eingefrorenem Zustand konnte durch Rechromatographie noch nach vier Wochen bestätigt werden. Die Fragestellung, ob es sich beim big hGH um ein Aggregationsprodukt (little hGH Dimer bzw. little hGH an ein anderes Trägerprotein gekoppelt ?) handelt, sollte durch Behandlung mit 7 M Guanidiniumchlorid näher untersucht werden. Hochmolare Lösungen von chemisch träge reagierenden Stickstoffverbindungen, wie Harnstoff oder Guanidin, greifen nicht kovalente

Bindungen (z.B. Wasserstoffbrücken) an und können sie zum Teil lösen. Big hGH, das durch Gelfiltration von Kabi-hGH isoliert worden war, blieb bei Zimmertemperatur eine Stunde in 7 M Guanidiniumchlorid-Lösung (Fa. Merck, Art.Nr. 4220) und wurde dann auf der Sephadex G-75 Säule rechromatographiert, wobei durch die Molekulargewichtsunterschiede eine schnelle Trennung von Guanidin (MG 92,5) und Protein erfolgt. In Abb. 15 sind die Elutionsdiagramme von normalem und so behandeltem big hGH aufgezeichnet. Unbehandeltes big hGH wurde zu 93% wieder an gleicher Stelle eluiert, 2% vorher (big-big Bereich), 5% nachher (little Bereich), was die früheren Erfahrungen bestätigte. Die Wiederfindequote der aufgetragenen 3,6 ug betrug 95%. Von den 3 ug mit Guanidiniumchlorid behandeltem big hGH waren im Eluat nur mehr 67,8% immunologisch meßbar, während bei allen anderen Chromatographien die Wiederfinderate um 90% lag. 24,5% der Gesamtimmunoreaktivität fanden sich im big-big Bereich, 56,9% blieben Guanidin-stabil, 18,6% wurden als little hGH wiedergefunden. Vergleicht man die absoluten Werte der beiden Rechromatographien unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Auftragsmengen 3,6 bzw. 3,0 ug, so stieg durch die Guanidinbehandlung der big-big Anteil um das 7-fache, little hGH verdoppelte sich, wobei die geringere Wiederfinderequote nicht berücksichtigt ist; d.h. durch Guanidin-Behandlung entsteht aus big hGH sowohl big-big hGH als auch little hGH, ein Teil wird aber so verändert, daß er immunologisch nicht mehr meßbar ist.

In zwei weiteren Versuchen konnte diese Beobachtung generell bestätigt werden, wenn auch die Wiederfinderraten ziemlich schwankten. Weiterhin wurde das sich primär als Guanidin-stabil erwiesene big hGH einer erneuten Behandlung mit Guanidin unterzogen. Abgesehen von noch geringeren Wiederfinderraten fanden sich danach analoge Ergebnisse.

In Tab. 6 sind alle Ergebnisse der Behandlung von big hGH mit Guanidiniumchlorid zusammengestellt.

Tab. 6: Rechromatographie von big hGH nach Behandlung mit 7 M Guanidiniumchlorid.

	big-big hGH	big hGH	little hGH	Wieder- finderate
1. Gua- Behandlung	24,5% 505,8 ng	56,9% 1156,2 ng	18,6% 273,0 ng	67,8%
1. Gua- Behandlung	15,3% 922,0 ng	65,2% 3915,0 ng	19,5% 1172,0 ng	81,0%
2. Gua- Behandlung	13,2% 15,2 ng	62,1% 71,4 ng	24,7% 28,4 ng	23,0%
1. Gua- Behandlung	14,8% 690,0 ng	54,4% 2516,0 ng	30,8% 1429,0 ng	49,6%
2. Gua- Behandlung	18,2% 47,5 ng	63,5% 163,8 ng	18,3% 47,8 ng	52,5%

3.1.4.2. Behandlung von little hGH
mit Guanidiniumchlorid

Little hGH wurde zum Vergleich ebenfalls nach Behandlung mit 7 M Guanidiniumchlorid rechromatographiert.

Dabei wurde es als homogener Peak zu 99,2% wieder an gleicher Stelle bei K_D 0,8 eluiert, 0,8% fand sich im big-big Bereich. Von der aufgetragenen Gesamtmenge waren jedoch im Eluat nur mehr 37,7% radioimmunologisch meßbar, d.h. bei mehr als der Hälfte war die immunologische Determinante des Moleküls zerstört worden.

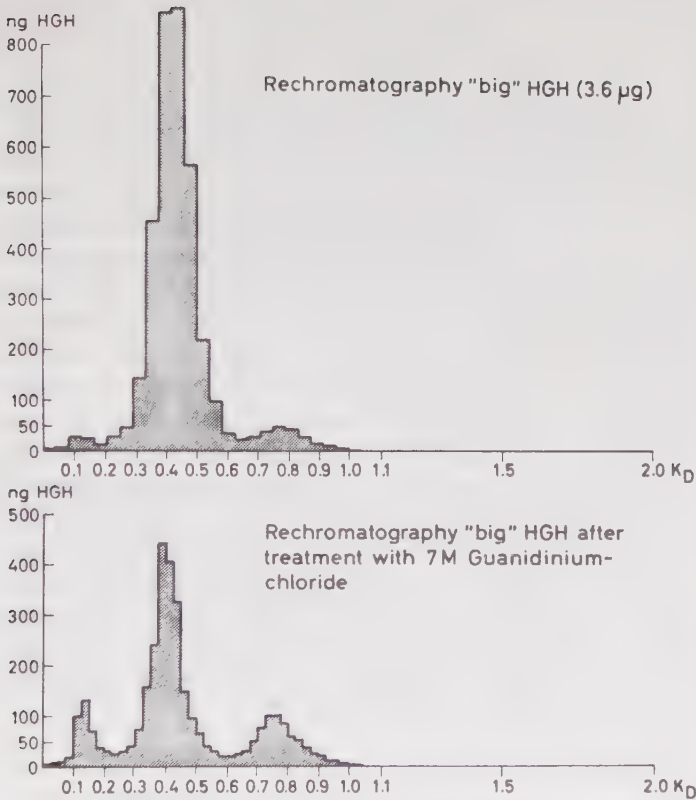


Abb. 15: Rechromatographie von big hGH vor (oben) und nach (unten) Behandlung mit 7 M Guanidiniumchlorid. Mit dieser Behandlung ließ sich eine partielle Umwandlung von big hGH in little hGH erzielen, wobei jedoch die Wiederfindequote von 95% auf 67,8% sank.

3.2. Untersuchungen von Rattenwachstumshormon

3.2.1. rGH-Standardpräparationen

3.2.1.1. Gelfiltration der Standardpräparationen

Die als Standard eingesetzte Referenzpräparation rGH RP-1 und das hochgereinigte rGH I-2, das zur Markierung verwendet wird, wurden über die Sephadex G-75 Säule chromatographiert (Abb. 16). Bei beiden Präparationen fällt eine deutliche Heterogenität auf. Signifikante Mengen von rGH-Immunoreaktivität werden jeweils mit dem Ausschlußvolumen eluiert; ferner findet man einen deutlichen Peak bei K_D 0,4, das sogenannte big rGH in Analogie zur Nomenklatur beim hGH. Der Hauptpeak wird bei K_D 0,75 gemessen, was dem Peak III des $^{125}\text{J-rGH}$ entspricht und das reguläre oder little rGH mit einem Molekulargewicht von 22500 darstellt. Somit wird rGH durch Dextrangelfiltration in praktisch identischer Weise fraktioniert wie menschliches Wachstumshormon bei freilich unterschiedlicher prozentualer Verteilung der 3 Komponenten. Auffallend ist, daß die reinere Präparation mit der größeren biologischen Aktivität einen relativ geringeren little rGH-Anteil (43%) aufweist als die weniger gereinigte Referenzpräparation (60%), dafür aber hier der big rGH-Anteil mit 46% groß ist gegenüber 25% dort; im Ausschlußvolumen werden 11% bzw. 15% eluiert. Die bei der Rechromatographie von frisch markiertem $^{125}\text{J-rGH}$ (Abb. 4) gefundenen 3 Peaks sind lageidentisch mit den 3 eben beschriebenen rGH-Fractionen.

3.2.1.2. Radioimmunologisches Verhalten der Standardpräparationen

Wie in Abbildung 17 dargestellt, ergaben die beiden rGH-Präparationen trotz unterschiedlicher chromatographischer Auftrennung annähernd parallele Standardkurven; im unteren Teilstück zeichnet sich aber eine beginnende Divergenz ab. Während die biologische Aktivität des Markierungs-rGH-I-2 mit 1,5 IE/mg 2,5-fach höher ist als die der Referenzpräparation rGH-RP-1 mit 0,6 IE/mg,

war die radioimmunologische Potenz von ersterem allerdings nur knapp doppelt so hoch: Eine 50-prozentige Verdrängung des rGH-Tracers erreichte rGH I-2 bei einer Konzentration von 5,5 ng/tube = 55 ng/ml, wenn 0,1 ml Standard eingesetzt wird, und rGH RP-1 bei einer Konzentration von etwa 100 ng/ml.

3.2.1.3. Immunoreaktives Verhalten der durch
Chromatographie isolierten 3 rGH-Fraktionen

Durch die Bestimmung von Verdünnungsreihen konnte gezeigt werden, daß sich die drei rGH-Fraktionen hinsichtlich ihrer immunologischen Reaktivität nicht identisch verhalten. Die Verdünnungskurve der Immunoreaktivität, die im Ausschlußvolumen eluierbar war, das sogenannte big-big rGH, verlief deutlich steiler als die Standardkurve, so daß es zu einer Diskrepanz zwischen gemessenen und berechneten rGH-Konzentrationen kam. Das Gleiche traf für die rGH-Immunoreaktivität zu, die bei K_D 0,4 eluiert wurde, das sogenannte big rGH. Im Gegensatz dazu verlief die Verdünnungskurve des little rGH flacher als die Standardkurve, was ebenfalls zu einer Diskrepanz zwischen gemessener und berechneter Konzentration in den einzelnen Verdünnungen führte; allerdings lagen jetzt die gemessenen Werte deutlich niedriger als die berechneten.

Analog zu den Versuchen beim hGH (3.1.3.2.) wurden Verdrängungsversuche von Peak I-, Peak II- und Peak III- ^{125}J -rGH-Tracer durch "kaltes" big-big, big und little rGH durchgeführt. Für jede als Tracer eingesetzte ^{125}J -rGH-Fraktion erhält man drei Standardkurven entsprechend den drei durch Chromatographie isolierten Standards (Abb. 18).

Peak I-Tracer wird allein durch die hochmolekulare rGH-Immunoreaktivität aus seiner Antikörperbindung signifikant verdrängt, wohingegen big rGH nur zu einer geringgradigen und little rGH zu nahezu garkeiner Hemmung der Peak I-Tracerbindung führt. Der Peak II-Tracer läßt sich von allen drei rGH-Fraktionen deutlich

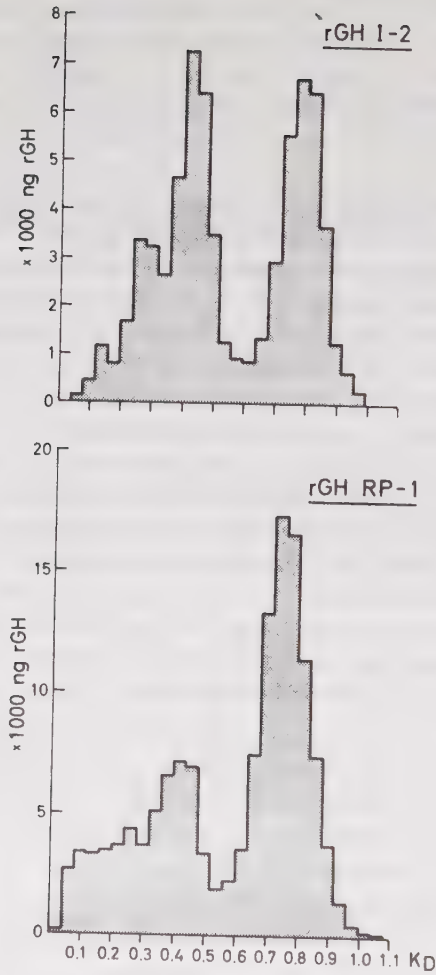


Abb. 16: Gelfiltration der Referenzpräparation rGH RP-1, die als Standard eingesetzt wird (unten) und des hochgereinigten rGH I-2, das zur Markierung verwendet wird (oben).

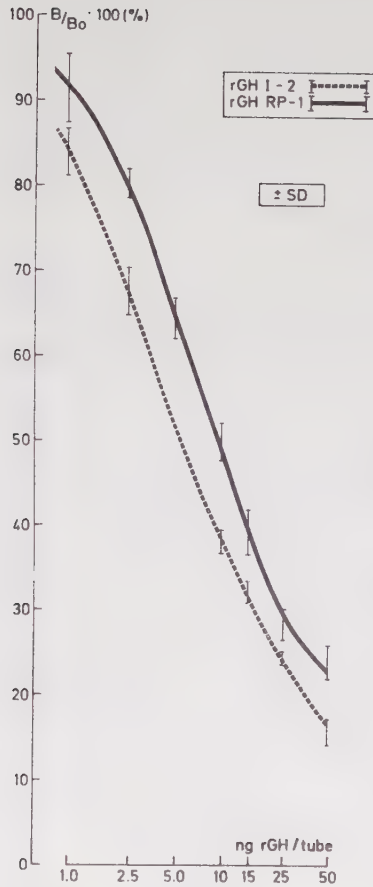


Abb. 17: Standardkurven von rGH-I-2 und rGH-RP-1 mit Peak III-rGH-Tracer.
Der 50%-Intercept liegt für das rGH I-2 bei 5,5 ng/tube, für das rGH RP-1 bei 10,0 ng/tube.

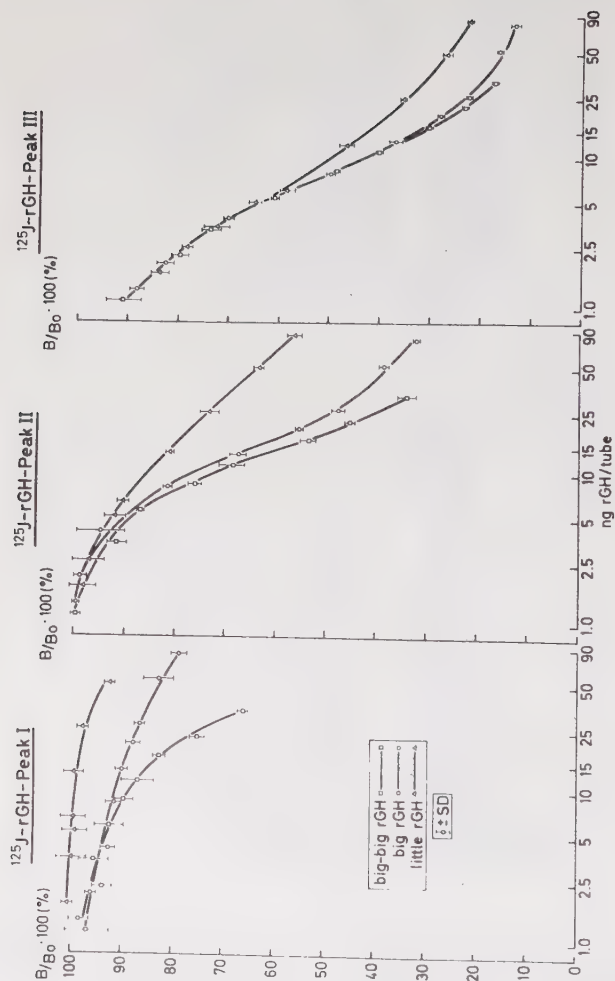


Abb. 18: Standardkurven von big-big rGH (○—○), big rGH (□—□) und little rGH (△—△) mit den verschiedenen $^{125}\text{J-rGH}$ -Tracern.

verdrängen. Wiederum zeigte sich aber die steilste Verdrängungskurve mit Peak II-Tracer bei der Verwendung der hochmolekularen Immunoreaktivität. Auch wenn Peak III-Tracer, also das markierte reguläre rGH mit einem Molekulargewicht von 22500, als Tracer eingesetzt wurde, kam es zu divergierenden Standardkurven, je nachdem, welche Immunoreaktivität verwendet wurde. Auch hier zeigten die höhermolekularen rGH-Fraktionen eine stärkere Verdrängung von Peak III-Tracer als es little rGH vermochte.

3.2.2. Serum-rGH

Im Gegensatz zur Dextrangelfiltration der Standardpräparation fand sich bei Chromatographie der Serum-rGH-Immunoreaktivität nur ein Hauptpeak im Ausschlußvolumen (Abb. 20).

Lediglich in einem Serum fand sich ein kleiner Peak von little rGH (oberes Elutionsdiagramm). Die absoluten Werte dieser Fraktionierung sind nur eingeschränkt zu bewerten, da alle verdünnten Seren in ihren Verdünnungskurven so weit von der Standardkurve abwichen, daß die Elutionsdiagramme nur eine qualitative Aussage gestatten. Ein Eiweißeffekt als Ursache dieser Diskrepanz konnte ausgeschlossen werden, da Standardkurven in Rinderserum nicht von den in Puffer durchgeführten abwichen. Auch die Benutzung von zwei verschiedenen Antikörpern für die Präzipitation des Antikörper-gebundenen rGH brachte keine Erklärung für die fehlende Parallelität von Serumverdünnung und Standardkurve.

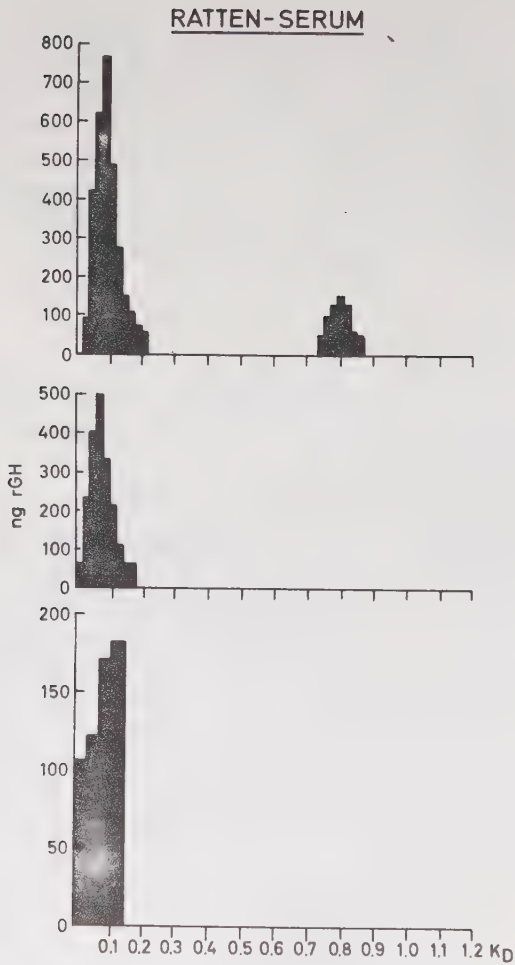


Abb. 19: Gelfiltration von Rattenserum.

Es wurden jeweils 10 ml Serum aufgetragen. Im Gegensatz zu den Hypophysenpräparationen wurde die rGH-Immunoreaktivität des Serums im Ausschlußvolumen eluiert.

3.2.3. rGH-Hypophysenextrakte

3.2.3.1. Gelfiltration der rGH-Hypophysenextrakte

Zur Untersuchung des hypophysären rGH wurden zwei Gruppen mit je neun Ratten gebildet; die eine Gruppe sollte als Kontrollgruppe fungieren, die andere wurde einem Kältestreß ausgesetzt und zwar drei Stunden im Kühlraum bei 4° C. Alle Ratten wurden nach kurzer Äthernarkose durch Dekapitieren getötet, die Hypophysen entnommen und je drei Stück in 0,05 M Phosphatpuffer homogenisiert. Nach Abzentrifugieren wurde der Überstand auf der Sephadex G-75 Säule chromatographiert. Die Fraktionierung der so gewonnenen Hypophysenextrakte ergab relativ konstante Befunde und zwar ohne signifikanten Unterschied bei beiden Gruppen. Es fand sich jeweils ein Hauptpeak bei K_D 0,75, entsprechend dem little rGH der Standardpräparationen, ein kleiner Peak bei K_D 0,4, sogenanntes big rGH, und rGH-Immunoreaktivität konnte ebenfalls im Ausschlußvolumen nachgewiesen werden (Abb. 20). Das Fehlen der big Fraktion im unteren Elutionsdiagramm ist auf zu geringen rGH-Gesamtgehalt zurückzuführen, so daß diese Werte nicht mehr in den ablesbaren Bereich der Eichkurve kamen.

3.2.3.2. Verdünnungskurven der rGH-Hypophysenextrakte

Die Verdünnungskurven von hypophysärem Extrakt, der aus den jeweils drei gepoolten Hypophysen gewonnen wurde, liefen annähernd parallel zur Eichkurve (Abb. 21). Lediglich die Kurve 1a fällt etwas heraus, da die dazugehörige Probe unzureichend homogenisiert war, was auch in der Chromatographie gezeigt werden konnte.

Die Kurven 1a, b, c repräsentieren die Kontrollgruppe, die Kurven 2a, b, c die Gruppe der vorher dem Kältestreß ausgesetzten Tiere. Für beide Gruppen ließen sich folgende rGH-Konzentrationen pro Hypophyse ablesen:

1a = 305 ug rGH, 1b = 242 ug rGH, 1c = 238 ug rGH
2a = 463 ug rGH, 2b = 181 ug rGH, 2c = 108 ug rGH.

Vergleicht man beide Gruppen, so ist nach dreistündiger Kälteexposition entgegen früheren Angaben (59a) keine signifikante Änderung im Wachstumshormongehalt festzustellen. Aus den so gemessenen Werten konnte ein mittlerer rGH-Gehalt von 295 ± 64 ug/Hypophyse errechnet werden.

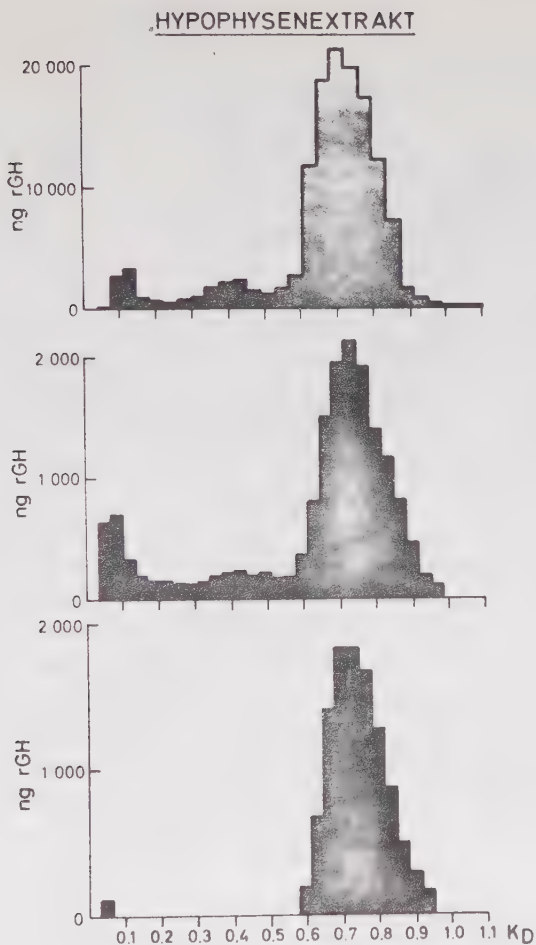


Abb. 20: Gelfiltration von 3 Hypophysenextrakten, die jeweils wieder aus 3 gepoolten Hypophysen gewonnen wurden.
Im Gegensatz zu den rGH-Standardpräparationen eluiert die rGH-Immunoreaktivität der Hypophysen-homogenate mit einem Hauptpeak bei K_D 0,75.

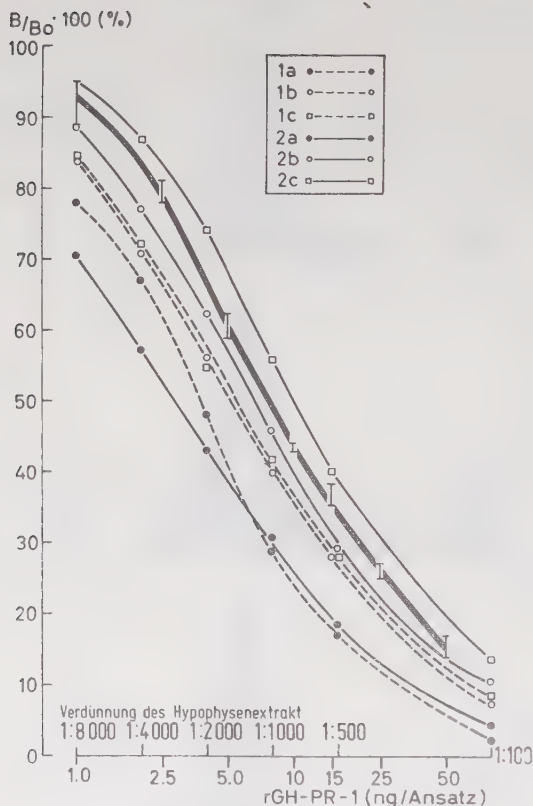


Abb. 21: Verdünnungskurven von 6 Hypophysenextrakten.
Die Kurven 1a, b, c (gestrichelte Kurven) repräsentieren die Kontrollgruppe,
die Kurven 2a, b, c (durchgezogene Kurven) die Gruppe der vorher dem Kältestreß ausgesetzten Tiere (3 Stunden bei + 4° C).
Eine Kurve resultiert jeweils aus der Verdünnung des Homogenats von 3 Rattenhypophysen.

4.

DISKUSSION

Menschliches Wachstumshormon

Ausgangspunkte dieser Arbeit waren zum einen die Diskrepanz zwischen radioimmunologisch gemessenen hGH-Spiegeln und biologischer Aktivität, besonders beim Krankheitsbild der Akromegalie, zum anderen die in unserer Arbeitsgruppe gemachte Beobachtung, daß sich nach Stimulation durch Insulinhypoglykämie das immunoreaktive Verhalten des vermehrt sezernierten Wachstumshormons ändert (103). Letzteres wird durch die Abweichung der Verdünnungskurve des 90-Minuten-Wertes von der Standardkurve dokumentiert, während die übrigen Werte parallel verlaufen (104).

Ebenso könnten Änderungen der antigenen Determinante des Moleküls während der Sekretion oder durch Katabolismus entstehen. Ersteres war jedoch bereits ausgeschlossen, die Spezifität des Antikörpers gesichert (siehe 2.2.3.4.) und in allen Akromegaliaseren war eine identische hGH-Immunoreaktivität gefunden worden, so daß die Güte des Radioimmunoassays als gesichert gelten konnte.

Nur wenn Personen mit normaler hGH-Sekretion untersucht wurden, zeigte sich 90 Minuten nach Insulinverabreichung eine Änderung in der hGH-Immunoreaktivität. Eine ähnliche Beobachtung machten LANDON et al. (62) beim ACTH nach maximaler Stimulation der Sekretion. Als mögliche Erklärung böten sich zwei unterschiedliche Mechanismen an:

1. Katabolismus des zirkulierenden Hormons führt zu Bruchstücken mit nur mehr teilweise erhaltener immunologischer Determinante.

2. Nach maximaler Stimulation sezerniert die Hypophyse Hormonvorstufen, die sich immunoreaktiv anders als das reguläre Hormon verhalten.

Die erste Erklärung erscheint unwahrscheinlich, weil Katabolismus auch in Patienten mit Akromegalie vorkommen sollte. Da außerdem exogenes Wachstumshormon nach intravenöser Infusion sein immunoreaktives Verhalten über zwei Stunden hin nicht verändert (103), während endogenes hGH schon 90 Minuten nach der Insulingabe eine veränderte Immunoreaktivität zeigt, kann man wohl Katabolismus als Ursache ganz ausschließen.

Wenn die Hypophyse Hormonvorstufen sezerniert und diese eine veränderte Immunoreaktivität hervorrufen, kann man erwarten, daß sich diese auch in anderen Eigenschaften vom regulären Hormon unterscheiden, so z.B. in der Molekülgröße. Diese schon beim Insulin gemachte Erfahrung (94) veranlaßte die gelchromatographischen Untersuchungen über die molekulare Heterogenität des Wachstumshormons.

Molekulare Heterogenität des hGH

Molekulare Heterogenität wurde in letzter Zeit für viele Peptidhormone beschrieben: Neben dem genannten Insulin (94) für das Parathormon (8), Gastrin (112), ACTH (115), Glukagon (77) und das Vasopressin (78). Und zwar ließen sich durch Chromatographie jeweils eine oder zwei höhermolekulare Formen vom regulären Hormon abgrenzen.

Wir fanden für das Wachstumshormon neben dem regulären little hGH eine Form, die bei Gelfiltration über Sephadex G-75 weniger zurückgehalten wurde, das sogenannte big hGH. Dazu wurde regelmäßig im Ausschußvolumen eluiertes immunoreaktives Material gefunden, das wir in Analogie zum big-big Gastrin (113) big-big hGH nannten. Alle drei hGH-Komponenten konnten sowohl im Serum von Akromegalen und bei Normalpersonen nach Stimulation durch Insulinhypoglykämie, als auch in einer hypophysären hGH-Präparation nach ROOS (80) nachgewiesen werden. Auch im Homogenat einer frisch entnommenen Leichenhypophyse - allerdings hier in unterschiedlicher Verteilung - fanden sich alle drei

hGH-Komponenten. Der big Anteil bei sechs untersuchten Akromegalenseren (Tabelle 2) liegt zwischen 6,5 und 12,2%, der big-big Anteil zwischen 0,5 und 2,2%; ähnlich verhielt sich die Standardpräparation. Signifikant erhöht ist jedoch der big Anteil und auch der big-big Anteil nach maximaler Stimulation durch Insulinhypoglykämie sowie bei der homogenisierten Leichenhypophyse. Die Heterogenität von hGH-Hypophysenpräparationen war schon früh durch immunoelektrophoretische Methoden (15, 52), Stärkegel-Elektrophorese (2, 5, 28) und auch Gelfiltration (55, 66, 95) aufgezeigt worden. Bei all diesen Untersuchungen handelte es sich jedoch um Raben-Präparationen, deren Extraktion mit Eisessig bei 70° C erfolgt (76), so daß eine Abgrenzung zwischen physiologischer und erst sekundärer Heterogenität praktisch nicht möglich war. Hingegen erwies sich endogenes Serum-hGH in der Stärkegel-Elektrophorese als homogener schmaler Peak hinter dem Albumin, was BERSON und YALOW 1966 zuerst beschrieben (5). Gleichzeitig konnten sie zeigen, daß weder Hypophysen-hGH, das zu Serum zugegeben wurde, noch endogenes Serum-hGH an normale Serumproteine gebunden wird, und somit diesbezügliche Hypothesen (46) widerlegen.

BALA et al. (1) untersuchten als erste systematisch Serum-hGH mittels Gelchromatographie. Sie fraktionierten Serum von Normalpersonen und Akromegalen über Sephadex G-75 Säulen und erzielten Ergebnisse, die sich auffällig von unseren unterscheiden. Mehr als 50% der gesamten hGH-Immunoreaktivität wurde bei allen untersuchten Seren im höhermolekularen Bereich eluiert sowie signifikante Mengen nach dem regulären Hormon. Da sich die Peaks breit verwaschen darstellten, diskutieren auch die Autoren den "zone spreading effect" der Säule als entscheidenden Faktor neben der Heterogenität des Hormons. Der Unterschied zwischen ihren Resultaten und unseren müßte somit auf die unterschiedlichen Bedingungen in der Ausführung der Gelfiltration zurückzuführen sein.

Hingegen zeigen unsere Ergebnisse gute Übereinstimmung mit den Arbeiten von GOODMAN et al. (38) und GORDON et al. (40), die Serum-hGH von Akromegalen und Normalpersonen sowie hGH-Hypophysenpräparationen über Sephadex G-100 bzw. Sephadex G-75 fraktionierten und dabei eine klar abgegrenzte big und little hGH-Fraktion beschreiben. GORDON findet bei Akromegalen einen big hGH-Anteil zwischen 6 und 14%, bei Normalpersonen nach Stimulation durch Insulinhypoglykämie 24 - 37% big hGH, was wir voll bestätigen konnten, während GOODMAN bei Akromegalen zwischen 14 und 28% bis hGH gegenüber 25 - 28% bei Normalpersonen mißt. Beide Autoren fanden gewöhnlich geringe Mengen von hGH-Immunoreaktivität vor dem big Peak, worauf sie nicht näher eingingen. Dieses immuno-reaktive Material, das in allen unseren Chromatographien in geringer Menge im Ausschlußvolumen erschien und dessen Anteil im Serum-hGH von Normalpersonen signifikant höher war als bei Akromegalen, glauben wir als eigenständige 3. hGH-Komponente abgrenzen zu können und nennen es analog zu der auch beim Gastrin (113) und beim Insulin (114) gefundenen 2. höhermolekularen Form big-big hGH. BERSON und YALOW (9) beschreiben eine big Form der zirkulierenden hGH-Immunoreaktivität, die bei Gelfiltration über Sephadex G-75 vor Albumin eluiert wurde, d.h. im Ausschlußvolumen. Der Lage nach entspricht diese Komponente unserem big-big hGH, während die von uns big hGH genannte Form wegen der Kürze der Säule nicht klar abgrgrenzt wird, sondern wohl Ursache der Schulter am ansteigenden Hauptpeak sein dürfte. Ähnliches dürfte auch für das von FROHMAN et al. (33) beschriebene "large growth hormone" gelten, das nach Gelfiltration von Hypophysenextrakten über eine 50 cm lange Sephadex G-200 Säule im Ausschlußvolumen gemessen wurde.

Immunologische Heterogenität des hGH

Immunoidentität zwischen Standard und zu messender Probe ist ein unabdingbares Kriterium für einen Radioimmunoassay. Dies läßt sich prüfen, indem man eine Probe in verschiedenen Verdünnungen in den Assay einsetzt und die daraus resultierende Verdünnungskurve mit der Standardkurve vergleicht. Im Falle von Immunoidentität verläuft die Verdünnungskurve parallel zur Standardkurve, d.h. beide Kurven liegen übereinander, wenn man einen Verdünnungspunkt auf die Standardkurve projiziert. Bei Verwendung von normalem Tracer zeigten neben dem 90-Minuten-Wert bei Insulinhypoglykämie auch Verdünnungen einer frisch entnommenen Leichenhypophyse ein vom Standard-hGH unterschiedliches immunoreaktives Verhalten. Während das durch Gelfiltration von Standard-hGH isolierte little hGH sich immunoidentisch erwies, wichen die Verdünnungskurven von big-big hGH und big hGH bei beiden eingesetzten Antisera erheblich von der Standardkurve ab. Dies widerspricht den Ergebnissen von GOODMAN et al. (38), nach denen big und reguläres hGH eine identische Immunoreaktivität besitzen. Auch FROHMAN et al. (33) finden für das von ihnen beschriebene "large growth hormone" (entspricht unserem big-big hGH) kein unterschiedliches immunologisches Verhalten. Der Grund für diese Diskrepanz zwischen unseren Resultaten und den eben beschriebenen wurde offensichtlich, als höchst gereinigter ^{125}J -hGH-Tracer in den Radioimmunoassay eingesetzt wurde. Bei Verwendung dieses Tracers fielen nämlich die Verdünnungskurven von big-big, big und little hGH zusammen und ein Unterschied im immunologischen Verhalten konnte nicht mehr ausgemacht werden (Abbildung 14). Ebenso verhielt es sich mit dem Serum-hGH von Normalpersonen und dem frischen Hypophysenhomogenat.

Um diesen hochreinen Tracer zu erhalten, ist es notwendig, den von der Markierungssäule erhaltenen Tracer einer zweiten Chromatographie über Sephadex G-75 oder G-100 zu unterziehen. Dabei fanden wir drei Peaks von radioaktivem Material.

Peak I wird allgemein als "damaged" Tracer bezeichnet, da dieser Anteil erst durch die Markierung mit ^{125}J entsteht und somit ein Degradationsprodukt in Folge der Jodierung sein dürfte (11). Die so geschädigten Moleküle aggregieren leicht oder werden unspezifisch an Proteine gebunden (47) und erscheinen bei der Nachreinigung infolge ihrer Molekülgröße im Ausschlußvolumen. Bei Peak II dürfte es sich höchstwahrscheinlich um markiertes big hGH handeln, während Peak III-Tracer, der an gleicher Stelle wie little hGH eluiert wird, das gereinigte ^{125}J -markierte little hGH darstellt. Es ist interessant, daß der Anteil der Peak I-Radioaktivität nicht mit der spezifischen Aktivität der jeweiligen Markierung korreliert, wie ein Auszug aus dem Markierungsprotokoll zeigt (Tabelle 1). Weiterhin konnten wir zeigen, daß dieser hochreine Peak III-Tracer nicht stabil ist, sondern trotz Lagerung in der Kühltruhe bei -18°C mit der Zeit ansteigende Mengen von Peak I-Radioaktivität zu finden sind, so daß eine erneute Nachreinigung erforderlich wird. Dies beweist, daß es sich beim Peak I- ^{125}J -hGH um aggregiertes "damaged" Material handeln muß; dafür sprechen auch frühere Untersuchungen (89).

Andererseits ist dieses Material immer noch immunoreaktiv, was seine hohe Bindung an den hGH-Antikörper zeigt. Da der Peak I-Tracer weder durch little hGH noch signifikant durch big hGH aus seiner Antikörperbindung verdrängt wird, hingegen eindeutig durch das big-big hGH, könnte man sich so einen Assay zur spezifischen Aufdeckung von big-big hGH Immunoreaktivität im Serum vorstellen - freilich ist diese Bestimmungsmöglichkeit recht wenig sensitiv, da der 50%-Intercept bei 10,2 ng/ml liegt (Abbildung 16).

Neben der Beobachtung, daß Peak I-Tracer nur durch big-big hGH-Immunoreaktivität aus seiner Antikörperbindung verdrängt wird, konnten wir zeigen, daß auch bei Peak II-Tracer big und big-big hGH zu einer stärkeren Inhibition der Tracerbindung führen

als little hGH. Daß beide höhermolekulare Komponenten nach Stimulation durch Insulinhypoglykämie vermehrt im Serum vorkommen, erklärt die Veränderung der hGH-Immunoreaktivität nach Insulinhypoglykämie, wie sie in einem normalen Assay mit herkömmlichen Tracer zu beobachten war. Wir nehmen deshalb an, daß das veränderte immunologische Verhalten von hGH nach Insulinhypoglykämie auf eine vermehrte Sekretion der höhermolekularen hGH-Fraktionen big und big-big zurückzuführen ist. Da der Standard selbst nur 2% big-big hGH und unter 12% big hGH enthält, weichen alle Verdünnungskurven von endogenem und exogenem hGH, welches mehr höhermolekulare Bestandteile als der Standard besitzt, von der Standardkurve ab - so z.B. auch die Verdünnungskurve des Hypophysenhomogenats mit einem Anteil von nur 70,6% little hGH. Die Verwendung von hochgereinigtem Tracer (Peak III) ist deshalb bei allen Untersuchungen über die Heterogenität von Wachstumshormon von großer Bedeutung.

Charakterisierung der einzelnen hGH-Fraktionen

Die durch Gelfiltration aus der ROOS-Hypophysenpräparation gewonnenen big und little hGH-Fraktionen blieben bei uns in einer unmittelbar angeschlossenen Rechromatographie stabil, woran sich auch nach 4-wöchiger Lagerung nichts änderte. Hingegen beobachteten GOODMAN et al. (38) und auch GORDON et al. (40) eine mit der Lagerung fortschreitende Umwandlung von big hGH in little hGH, wenn serumfreies big hGH rechromatographiert wurde. Dagegen blieb der big hGH-Anteil eines Akromegalenserums, das sie über einige Zeit bestimmten, konstant, so daß man von einer Stabilität des Serum big hGH sprechen kann. Diese differierenden Ergebnisse könnten auf die unterschiedlichen Bedingungen der Gelfiltration zurückzuführen sein (wir chromatographierten bei Zimmertemperatur). Es ist aber wahrscheinlicher, daß die big Fraktion, die diese Autoren aus

Akromegalenserum isolierten, noch einen labileren Anteil besitzt, der bei der Hypophysenpräparation während der Extraktionsprozedur bereits in little hGH umgewandelt worden war. Dafür spricht auch, daß wir in einer frisch entnommenen Leichenhypophyse, die lediglich in Puffer homogenisiert war, einen viel höheren big hGH-Anteil fanden als in der ROOS-Hypophysenpräparation. Weiterhin konnten jetzt auch WRIGHT und GOODMAN (107) zeigen, daß das aus Hypophysenextrakten isolierte big hGH eine höhere Stabilität aufweist - nur 10% wurde bei Rechromatographie des big hGH-Anteils im little Bereich wiedergefunden. Werte unter 10% fanden auch wir, wobei jedoch eine gewisse Unreinheit der Fraktionen die gleiche Rolle spielen dürfte wie Umwandlung. Eine signifikante Umwandlung von big hGH zu little hGH konnten wir nur durch Behandlung mit 7 M Guanidiniumchlorid erzielen. Durch diese Prozedur war darüber hinaus ein Anstieg einer hochmolekularen hGH-Immunoreaktivität zu beobachten, die im Ausschlußvolumen der Säule eluiert wurde und damit von big-big hGH nicht unterscheidbar war, sowie eindeutig erniedrigte Wiederfindequoten. Noch stärker war die Wiederfindung nach der Chromatographie von Guanidin-behandeltem little hGH reduziert. Dies und die Tatsache, daß die immunologische Determinante von little hGH in einer 7 M Guanidin-Lösung zwar instabil ist, little hGH jedoch in keine andere Komponente umwandelbar ist, (ver)föhren zu folgender Erklärungsmöglichkeit:

"Big hGH, das danach little hGH in nicht-kovalenter Bindung an ein anderes Eiweißmolekül darstellen sollte, wird in 7 M Guanidin in little hGH umgewandelt, was seinerseits jedoch in dieser Lösung nicht stabil ist und somit zu erniedrigten Wiederfindequoten föhrt. Das hypothetische Trägerprotein aggregiert zu höhermolekularen Einheiten und bleibt immunoreaktiv; dieser Vorgang wäre auch als physiologische Entstehungsmöglichkeit von big-big hGH im Serum denkbar".

WRIGHT und GOODMAN (107) föhrten ähnliche Untersuchungen von big hGH in hochmolaren Harnstoff-Lösungen durch. Das von ihnen

postulierte "Harnstoff-stabile" big hGH konnten wir nicht bestätigen - das in einer 1. Guanidin-Behandlung noch stabil gebliebene big hGH war in einer 2. Behandlung analog zur ersten weiter umwandelbar (Tabelle 6).

Ob big-big hGH nur aggregiertes immunoreaktives Material darstellt, oder eine völlig eigenständige Komponente ist, bleibt offen. Die Ähnlichkeit mit Peak I-Tracer, bei dem es sich offensichtlich um "damaged"-Material, das durch die Jodierung entstanden ist, handeln muß, ist auffallend. Daß es im Ausschlußvolumen eluiert wird und allein Peak I-Tracer aus der Antikörperbindung verdrängen kann, mag rein zufällig sein. Weiterhin ist sehr fraglich, ob die big-big hGH-Immunoreaktivität, die wir in Serum, Hypophyse und nach Guanidin-Behandlung finden, immer identisch ist.

Schlußfolgerung und Ausblick

Die Einordnung einer Hormon-Fraktion mit einem höheren Molekulargewicht als das gereinigte reguläre Hormon läßt nach MELANI (68) rein theoretisch an folgende Möglichkeiten denken:

1. Prohormon
2. Dimer oder Polymer
3. paraneoplastische Form
4. Serum-Protein-Bindung
5. Artefakt.

Nach unseren Ergebnissen und denen anderer Autoren (5, 9, 38, 40, 68) erscheint eine Serum-Protein-Bindung praktisch ausgeschlossen. Gegen die Dimerhypothese, die durch das etwa doppelt so hohe Molekulargewicht von big wie little hGH gestützt wird, sprechen die Ergebnisse der Guanidin-Versuche. Deshalb halten wir die Spekulation für gerechtfertigt, daß es sich zumindest beim big hGH um ein zirkulierendes Prohormon des Wachstumshormons handelt. Die Tatsache, daß sich genügend little hGH in der

Hypophyse befindet und so keine Notwendigkeit für die Sekretion unvollständiger Produkte besteht, spricht nicht dagegen, da bereits für das Insulin gezeigt wurde, daß trotz eines hohen Insulingehalts der Pankreas frisch synthetisiertes Insulin und Proinsulin ausschüttet, wenn ein kontinuierlicher Reiz mit Glukose besteht (3, 17).

Die Rolle der big-big hGH-Immunoreaktivität in der Zirkulation ist nicht klar. Das in der Hypophyse gefundene big-big hGH soll nach in vitro-Versuchen (33) eine Synthese-Zwischenstufe mit hoher Umsatzrate darstellen. Unklar bleibt die Zuordnung zu den Ergebnissen anderer Autoren, die in den Hypophysen von Föten zwar eine big-big Aktivität finden, jedoch kein big hGH (27). Die Ergebnisse der molekularen und immunologischen Heterogenität von hGH geben freilich noch keine Antwort auf die Ursache der Diskrepanz zwischen radioimmunologisch gemessenen hGH-Spiegeln und klinischer Ausprägung der Akromegalie. Erste Ansätze liefert die neu eingeführte Methode des Radioreceptorassays, bei dem markiertes und kaltes Hormon um Bindungsstellen an Zellen konkurrieren. Diese Affinität korreliert eng mit der in vivo biologischen Aktivität. Mit einem Kaninchenleber-Receptorassay (96) messen HERINGTON et al. (51) bei 29 von 33 Akromegalen signifikant niedrigere hGH-Spiegel als mit dem Radioimmunoassay. Big hGH konnte mit diesem Assay nicht dargestellt werden, was die Ergebnisse von GORDON et al. (39) bestätigt, der in einem Lymphozyten-Receptorassay eine stark verminderte biologische Aktivität von big hGH findet. GUYDA (45a) verwendet einen modifizierten Kaninchenleber-Assay und beobachtet das gleiche Phänomen. Die Existenz von zirkulierenden Hormonformen mit reduzierter biologischer Aktivität konnte bereits für das ACTH gezeigt werden (12). Eine wichtige Rolle spielt dabei das big ACTH, dessen biologische Aktivität unter 4% seiner Immunoreaktivität liegt und das mit Trypsin in voll biologisch aktives Hormon umwandelbar ist (34).

Andererseits sprechen beim hGH neuere Untersuchungen dafür, daß im Rattentibiastest auch nicht intaktes Hormon biologisch aktiv ist (91). Ob dies in Zusammenhang mit den jüngst beschriebenen Isohormonen steht, die sich nur auf Grund physikalischer Eigenschaften unterscheiden lassen, jedoch unterschiedliche biologische Aktivität besitzen sollen (20, 108, 109), ist noch nicht klar.

Rattenwachstumshormon

Das in analoger Weise zum hGH untersuchte Rattenwachstumshormon erbrachte auffallend ähnliche Ergebnisse. Nach Gelfiltration von Standardpräparationen und frischen Hypophysenextrakten fanden sich drei verschiedene rGH-Fraktionen, das reguläre little rGH, mit ungefähr doppeltem Molekulargewicht das big rGH und im Ausschlußvolumen eine Fraktion mit sehr hohem MG, das big-big rGH, das mit dem von FROHMAN und STACHURA (30) beschriebenen "large growth hormone" identisch sein müßte.

Hinsichtlich des immunologischen Verhaltens bestätigten sich ebenfalls die beim hGH gemachten Erfahrungen: Nur big-big rGH kann Peak I-rGH-Tracer aus seiner Antikörperbindung verdrängen und Peak II-Tracer wird von jeder Fraktion signifikant verdrängt, stärker jedoch von den höhermolekularen Formen. Bei Verwendung von Peak III-Tracer erhält man zwar die steilsten Standardkurven, aber diese zeigen im unteren Kurvenabschnitt weiterhin einen divergierenden Verlauf.

Alles in allem entspricht molekulare und immunologische Heterogenität von rGH der von hGH. Interessant dazu ist eine Untersuchung von STACHURA und FROHMAN (92), bei der Hypophysengewebe mit ^{14}C und ^3H Aminosäuren oder Nukleotiden inkubiert wurde und nach Extraktion eine gelchromatographische Auftrennung der Wachstumshormonaktivität erfolgte. Dabei zeigte sich big-big rGH als die in der Biosynthese zuerst beobachtete Form von hypophysärem rGH, das wahrscheinlich an RNS gekoppelt ist, während die Radioaktivität erst später in der big und little

Form vorkam. Die höhermolekularen Fraktionen dürften also auch beim rGH am ehesten als Hormonvorstufen zu deuten sein.

rGH-Spiegel im Serum zu bestimmen, war uns mit unseren Reagenzien nicht möglich, da die Serum-Verdünnungskurven stark von der Standardkurve abwichen. Nach der Gelfiltration von Serum-rGH-Immunoreaktivität fand sich nur ein Hauptpeak im Aus-schlußvolumen. Da die höhermolekularen Fraktionen in der Hypophyse nur um 20% der Gesamtimmunoreaktivität ausmachen, ist es nicht zu erwarten, daß im Serum ausschließlich big-Formen vorkommen sollten; darüber hinaus halten wir ja die big Formen für echte Hormonvorstufen. Vielmehr erscheint es uns am wahrscheinlichsten, daß das Serum-rGH an Protein gebunden vorliegt, welches den Radioimmunoassay mitbeeinflusst (102).

Trotz dieses spezifischen Unterschieds des zirkulierenden Hormons sind die Befunde, die wir beim hGH erhoben haben, den hier festgestellten sehr ähnlich. Inwieweit aus dem zum hGH kongruenten Verhalten der verschiedenen rGH-Fraktionen zu den entsprechenden Tracern auf ein allgemeines Verhalten bei Peptidhormonen geschlossen werden kann, ist noch offen und muß durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Theorie und Durchführung der Dextran-Gelfiltration mit Sephadex G-75 wird beschrieben. Diese Form der Chromatographie ist eine einfache und schnell durchführbare Methode für die Trennung von wasserlöslichen Substanzen, die hauptsächlich nach Unterschieden in der Molekülgröße erfolgt.

2. Menschliches Wachstumshormon (hGH) wurde mit Hilfe eines halb-automatisierten Doppelantikörper-Radioimmunoassays bestimmt, wobei drei verschiedene Antikörper verwendet wurden (Meerschweinchen-, Ziegen- und Knäinchen-Anti-hGH-Serum). Verdünnungskurven von Hypophysenextrakten und von Serumproben liefen parallel zur Standardkurve, was ihre Immunidentität zeigt.

Ein Doppelantikörper-Radioimmunoassay für Ratten-Wachstumshormon (rGH) wird beschrieben. In diesem "Assay" verliefen nur die Verdünnungskurven von Hypophysenextrakten parallel zur rGH-Standardkurve. Die Abweichung der Serum-Verdünnungskurven könnte man am besten mit der Proteinbindung von rGH erklären, die auch den Radioimmunoassay mitbeeinflusst.

3. Die hGH-Immunoreaktivität der Standardpräparation läßt sich durch Dextran-Gelfiltration in drei Komponenten von unterschiedlicher Molekülgröße auftrennen: 2% big-big hGH, das im Ausschlusßvolumen eluiert wird, 12% big hGH (MG ca. 43000) und 86% little hGH (MG 21500). Die Serumproben von sechs akromegalen Patienten mit hGH-Spiegeln zwischen 52,8 und 3100 ng/ml enthielten $1,45 \pm 0,68$ % (SD) big-big, $10,3 \pm 2,2$ % big und $88,3 \pm 2,2$ % little hGH.

Wenn bei gesunden Kontrollpersonen die hGH-Sekretion durch Insulinhypoglykämie stimuliert wurde und der 90-Minuten-Wert chromatographiert wurde, konnte ein signifikant höherer Prozentsatz von big-big (4,1 - 14%) und big hGH (24 - 30%) gemessen werden. Die Gelfiltration eines frischen Hypophysenhomogenats ergab ebenfalls

einen größeren Anteil der höher molekularen Fraktionen.

Nach Gelfiltration der zwei rGH-Standardpräparationen und der Ratten-Hypophysenhomogenate fanden sich drei immunoreaktive Peaks: Big-big rGH, big rGH und little rGH, welches das reguläre rGH darstellt. Das Elutionsprofil von Serum-rGH unterschied sich davon eindeutig. Der Hauptpeak wurde im Ausschlußvolumen eluiert, was auf die Proteinbindung zurückzuführen ist, die ihrerseits den nicht parallelen Verlauf der Verdünnungskurven bewirkt.

4. Die immunologische Heterogenität von hGH wurde untersucht durch den Vergleich der entsprechenden Verdünnungskurven mit der Standardkurve einer Referenzpräparation.

Endogenes hGH verhielt sich so immunidentisch mit dem Standard-hGH. Nur eine Serum-Verdünnungskurve (90 min nach Insulinhypoglykämie) wich vom Verlauf der Standardkurve ab. Daraus läßt sich schließen, daß der Wechsel der Immunoreaktivität auf den Anstieg der höher molekularen hGH-Formen zurückzuführen ist. Es konnte nämlich gezeigt werden, daß sich die Immunoreaktivität dieser Fraktionen vom Standard-hGH unterscheidet, wenn man den regulären ^{125}J -hGH-Tracer verwendet.

Die Chromatographie dieses Tracers ergab drei radioaktive Peaks: Peak I, Peak II und Peak III. Nur wenn der hochgereinigte Peak III-Tracer, der markiertes little hGH darstellt, verwendet wurde, fielen die Verdünnungskurven von big-big, big und little hGH zusammen und ein Wechsel in der Serum-Immunoreaktivität konnte nicht mehr beobachtet werden.

Das immunologische Verhalten von rGH war praktisch identisch mit dem von hGH.

5. Big und little hGH wurden ferner durch Rechromatographie vor und nach Behandlung mit 7 M Guanidiniumchlorid charakterisiert. Diese Behandlung bewirkte, daß ein signifikanter Teil von big hGH in der Elutionszone von little hGH wiedergefunden wurde, während little hGH keine Umwandlung zeigte.

Aus all diesen Ergebnissen schließen wir, daß little hGH das reguläre Wachstumshormon repräsentiert und zumindest ein Teil von big hGH zirkulierendes Prohormon sein müßte.

Ob big-big hGH nur aggregiertes big Hormon darstellt oder von völlig anderer Natur ist, bleibt offen.

SUMMARY

1. The theory and praxis of dextran gel-filtration with Sephadex G-75 is described. This form of chromatography is a simple and rapid method for the fractionation of water-soluble substances depending primarily on differences in molecular size.

2. Human growth hormone (hGH) was measured by a semiautomated double antibody radioimmunoassay using three different antibodies (guinea pig-, goat- and rabbit-anti-hGH-serum). Dilution curves of pituitary extracts and of serum samples ran parallel to the standard curve showing immuno-identity.

A double antibody radioimmunoassay for rat growth hormone (rGH) is described. In this assay only dilution curves of pituitary extracts were parallel to the rGH standard curve. The deviation of the serum dilution curves could be best explained by protein binding of rGH which also interferes with the radioimmunoassay.

3. hGH-immunoreactivity of the standard preparation resides in three distinct molecular components which can be separated by dextran gel-filtration: 2% big-big hGH eluting with the void volume, 12% big hGH (MW 43000) and 86% little hGH (MW 215000). The serum of six acromegalics with hGH-levels ranging from 52,8 to 3100 ng/ml contained $1,45 \pm 0,68\%$ ($\pm$ SD) big-big, $10,3 \pm 2,2\%$ big and $88,3 \pm 2,2\%$ little hGH.

When a serum sample which was obtained from a normal subject 90 min after stimulation of hGH secretion by insulin hypoglycemia was subjected to dextran gel filtration, a significant higher percentage of big-big (4,1 - 14%) and big (24 - 30%) was observed. The chromatography of a fresh pituitary homogenate also showed a greater portion of the higher molecular fractions.

The gel filtration of the two rGH standard preparations and of the rat pituitary homogenates revealed three immunoreactive peaks: Big-big rGH, big rGH and little rGH representing the

regular rGH. However, the elution pattern of serum rGH was found to be markedly different. The main peak eluted with the void volume which may be due to protein binding leading to non-parallel dilution curves.

4. The immunological heterogeneity of hGH was investigated by comparing the slope of the respective dilution curves with a standard curve of a reference preparation.

Endogenous hGH was found to be immunoidentical with the standard hGH. Only the slope of the serum dilution curve (90 min after insulin administration) was not parallel to the standard curve. This led to the conclusion that the change of immunoreactivity was apparently due to the increase in the larger molecular forms of the hGH immunoreactivity. Since these fractions were demonstrated to be different from the hGH standard using the regular ^{125}I -hGH-tracer.

This tracer could also be fractionated using dextran gel-filtration into three radioactive peaks: Peak I, peak II and peak III. Only if the highly purified peak III tracer representing labelled little hGH was used, the dilution curves of big-big, big and little hGH became superimposable and a change of serum hGH immunoreactivity (90 min after insulin administration) could not be detected.

The immunological behaviour of rGH was almost identical with hGH.

5. Big and little hGH were further characterized by rechromatography and treatment with 7 M guanidiniumchloride. This treatment effected that after chromatography a significant portion of big hGH was found in the area of little hGH, whereas little hGH showed no conversion. From all results we conclude that little hGH is the regular hormone and parts of big hGH must represent circulating hGH prohormone.

Whether big-big hGH is only aggregated big hormone or of totally different nature remains open.

6. LITERATUR

1. BALA, R.M., K.M.FERGUSON, J.C.BECK:
Plasma biological and immunoreactive
human growth hormone-like activity.
Endocrinology 87, 506 (1970)
2. BARETT, R.J., H.FRIESEN, E.B.ASTWOOD:
Characterization of pituitary and peptide
hormones by electrophoresis in starch gel.
J.Biol.Chem. 237, 432 (1962)
3. BENETT, L.L., G.M.GRODSKY:
Multiphasic aspects of insulin release
after glucose and glucagon.
In: Diabetes. Eds. J.Östman, R.D.G.Miller,
Excerpta medica, Amsterdam, 1969.
4. BENEVISTE, R., M.E.STACHURA, M.SZABO, L.A.FROHMAN:
Big growth hormone: Conversion to small
GH without peptide cleavage.
J.Clin.Endocrinol.Metab. 41, 422 (1975)
5. BERSON, S.A., R.S.YALOW:
State of human growth hormone in plasma
and changes in stored solutions of pituitary
growth hormone.
J.Biol.Chem. 241, 5745 (1966)
6. BERSON, S.A., R.S.YALOW:
Human growth hormone labeled with radio-
active iodine at high specific activity:
Preparation, purification and characteriza-
tion for immunochemical studies and IA.
In: Proceedings of the 1. Internat.Symposium
on growth hormone
Eds. Pecile, A., E.E. Müller,
ICS 158, Amsterdam (1968)
7. BERSON, S.A., R.S.YALOW:
Principles of immunoassay of peptide hormones
in plasma.
In: Clinical Endocrinology II,
Eds. Astwood, E.B., C.E. Cassidy,
Grune and Stratton, New York, 1968.
8. BERSON, S.A., R.S.YALOW:
Clinical applications of radioimmunoassay
of plasma parathyroid hormone.
Am.J.Med. 50, 623 (1971)

9. BERSON, S.A. R.S.YALOW:
 .Heterogeneity of peptide hormones in
 plasma as revealed by radioimmunoassay.
 In: Les Adenomes Hypophysaires Sécrétants.
 Endocrinopathies et Immunologie.
 Masson et Cie, Paris, 1971.
10. BERSON, S.A., R.S.YALOW:
 Immunologic specificity of peptide hormones.
 Excerpta med. (Amst.)
 In: Proteins and Polypeptide Hormones.
 Eds. Margoulies, M., F.C.Greenwood
 ICS 241, 38 (1971)
11. BERSON, S.A., R.S.YALOW:
 Radioimmunoassay.
 In: Methods in investigative and diagnostic
 endocrinology.
 Eds. Berson S.A., R.S.Yalow,
 Vol. 2A, p. 84, North Holland Publishing Comp.,
 Amsterdam, London, 1973.
12. BESSER, G.M., D.N.ORTH, W.E.NICHOLSON, R.L.BYNY,
 K. ABE, J.P.WOODHAM:
 Dissociation of the disappearance of bioactive
 and radioimmunoactive ACTH from plasma in man.
 J.Clin.Endocr. 32, 595 (1971)
13. BIRGE, C.A., G.T.PEAKE, I.K.MARIZ, W.H.DAUGHADAY:
 Radioimmunoassayable growth hormone in the
 rat pituitary gland: Effects of age, sex and
 hormonal state.
 Endocrinology 81, 195 (1967)
14. BOTTERMANN, P., R.ERMLER, J. HENNER:
 A semiautomatic method for immunoassay of
 insulin and human growth hormone.
 Horm.Met.Res. 3, 55 (1971)
15. BOUCHER, B.J.:
 Immunoelectrophoresis of human sera with
 antisera to Raben growth hormone.
 Nature 188, 1025 (1960)
16. BRAZEAU, P., W.VALE, R.BURGUS, N.LING, M.BUTCHER,
 J.RIVIER, R.GUILLEMIN:
 Hypothalamic polypeptide that inhibits the
 secretion of immunoreactive pituitary growth
 hormone.
 Science 179, 77 (1973)

17. BURR, J.M., W.STAUFFACHER, L.BALANT, A.E.RENOLD,
G.M.GRODSKY:
Dynamic aspects of proinsulin release from
the perfused rat pancreas.
Lancet Vol. II, 882 (1969)
18. CATT, K., H.D.NIALL, G.W.TREAGER:
A solid phase radioimmunoassay of human
growth hormone.
Biochem. J. 100, 310 (1966)
19. CATT, K., G.W. TREAGER:
Solid phase radioimmunoassay in antibody-
coated tubes.
Science 158, 1570 (1967)
20. CHRAMBACH, A., R.A.YADLEY, M.BEN-DAVID, D.RODBARD:
Isohormones of human growth hormones.
I. Characterization by electrophoresis and
isoelectric focusing in polyacrylamide gel.
Endocrinology 93, 848 (1973)
21. CRYER, P.A., W.H.DAUGHADAY:
Regulation of growth hormone secretion in
acromegaly.
J.Clin.Endocr. 29, 386 (1969)
22. DAUGHADAY, W.H., D.M.KIPNIS:
The growth promoting and antiinsulin action
of somatotropin.
Rec.Progr.Horm.Res. 22, 49 (1966)
23. DAUGHADAY, W.H.:
Sulfation factor regulation of skeletal growth.
Am.J.Med. 50, 277 (1971)
24. DEUBEN, R.R., J.MEITES:
Stimulation of pituitary growth hormone release
by a hypothalamic extract in vitro.
Endocrinology 74, 408 (1964)
25. DETERMANN, H.:
Gelchromatographie.
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1967.
26. ELLIS, S., R.W.GRINDELAND, J.M.NUENKE, P.X.CALLAHAN:
Isolation and properties of rat and rabbit
growth hormones.
Am.N.Y.Acad.Sci. 148, 328 (1968)
27. ESHET, R., S.ASSA, Z.LARON:
Heterogeneity of pituitary and plasma hGH from
fetuses, prematures and fullterm newborns.
1975, in press.

28. FERGUSON, K.A., A.L.C.WALLACE:
Prolactin activity of human growth hormone.
Nature 190, 629 (1961)
29. FLODIN, P.:
Methodological aspects of gel filtration
with special reference to desalting operations.
J.Chromatog. 5, 103 (1961)
30. FRANTZ, A.G., M.T.RABKIN:
Human growth hormone. Clinical measurement,
response to hypoglycemia and suppression by
corticosteroids.
New Engl.J.Med. 271, 1375 (1964)
31. FRIESEN, H., B.SHOME, C.BELANGER, P.HWANG, H.GUYDA,
R.MYERS:
The synthesis and secretion of human and
monkey placental lactogen (hPL and mPL) and
pituitary prolactin 6hPR and mPR).
Excerpta med. (Amst.)
In: Growth and growth hormone.
Eds. Pecile A., E.E.Müller
ICS 244 (1972).
32. FROESCH, E.R., B.MORELL, J.ZAPF, A.E.ZINGG, C.MEULI,
U.SCHLUMPF, R.HEIMANN, E.EIGENMANN, R.E.HUMBAL:
NSILA-S: Insulin-like properties, receptor
binding activities and relationship to
somatomedin.
Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 184, 183 (1974)
33. FROHMAN, L.A., L.BUREK, M.E.STACHURA:
Characterization of growth hormone of different
molecular weights in rat, dog and human
pituitaries.
Endocrinology 91, 262 (1972)
34. GEWIRTZ, G., B.SCHNEIDER, D.T.KRIEGER, R.S.YALOW:
Big ACTH: Conversion to biologically active
ACTH by trypsin.
J.Clin.Endocrinol.Metab. 38, 227 (1974)
35. GLICK, S.M., J.ROTH, R.S.YALOW, S.A.BERSON:
Immunoassay of human growth hormone in plasma.
Nature 199, 784 (1963)
36. GLICK, S.M., J.ROTH, R.S.YALOW, S.A.BERSON:
The regulation of growth hormone secretion.
Rec.Progr.Horm.Res. 21, 241 (1965)
37. GOLSTEIN-GOLAIRE, J., L.VANHAELEST:
Influence of the purification of ¹²⁵I-iodinated
thyreotropin on the sensitivity of the
radioimmunoassay.
Int.J.Appl.Rad.Isotop. 21, 17 (1970)

38. GOODMAN, A.D., R.TANENBAUM, D.RABINOWITZ:
Existence of two forms of immunoreactive growth hormone in human plasma.
J.Clin.Endocrinol.Metab. 35, 868 (1972)
39. GORDON, P., M.A.LESNIAK, C.M.HENDRICKS, J.ROTH:
"Big" growth hormone components from human plasma: Decreased reactivity demonstrated by radioreceptor assay.
Science 177, 829 (1973)
40. GORDON, P., C.M.HENDRICKS, J.ROTH:
Evidence for "big" und "little" components of human plasma and pituitary growth hormone.
J.Clin.Endocrinol.Metab. 36, 178 (1973)
41. GREENSPAN, F.S., C.H.LI, M.E.SIMPSON, H.M.EVANS:
Bioassay of hypophyseal growth hormone: The tibia test.
Endocrinology 45, 445 (1949)
42. GREENWOOD, F.C., W.M.HUNTER, J.S.GLOVER:
The preparation of ¹³¹I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity.
Biochem.J. 89, 114 (1963)
43. GREENWOOD, F.C., W.M.HUNTER, A.KLOPPER:
Assay of human growth hormone in pregnancy at parturition and in lactation.
Brit.Med.J. 1, 22 (1964)
44. GREENWOOD, F.C., J.LANDON, T.C.B.STAMP:
The plasma sugar, free fatty acid, cortisol and growth hormone response to insulin. I. In control subjects.
J.Clin.Invest. 45, 429 (1966)
45. GRODSKY, G.M., P.H.FORSHAM:
An immunochemical assay of total extractable insulin in man.
J.Clin.Invest. 39, 1070 (1960)
- 45a. GUYDA, H.J., S.WHYTE:
Heterogeneity of human growth hormone and prolactin secreted in vitro: Immunoassay and radioreceptor assay correlations.
J.Clin.Endocrinol.Metab. 41, 953 (1975)
46. HADDEN, D.R., T.E.PROUT:
A growth hormone binding protein in human serum.
Nature 202, 1342 (1964)

47. HADDEN, D.R., T.E. PROUT:
Studies on human growth hormone:
II, The effect of human serum on growth hormone
labelled with radioactive iodine.
Bull. John Hopk. Hosp. 116, 122 (1965)
48. HANSSEN, K.F.:
Radioimmunoassay of growth hormone in human
plasma.
Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 71, 649 (1972)
49. HAYASHIDA, T.:
Comparative immunochemical studies of
pituitary growth hormones.
Excerpta med. (Amst.)
ICS 244, 25 (1972)
50. HERBERT, V., K.S. LAU, C.W. GOTTLIEB, S.J. BLEICHER:
Coated charcoal immunoassay of insulin.
J. Clin. Endocr. 25, 1375 (1965)
51. HERINGTON, A.C., L.S. JACOBS, W.H. DAUGHADAY:
Radioreceptor and radioimmunoassay quantita-
tion of human growth hormone in acromegalic serum:
Overestimation by immunoassay and systematic
differences between antisera.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 39, 257 (1974)
52. HIRSCHFELD, J., C.A. GEMZELL, L. WIDE:
Immunoelectrophoretic studies on purified
growth hormone.
Nature 187, 64 (1960)
53. HUNTER, W.M., F.C. GREENWOOD:
A radioimmuno-electrophoretic assay for human
growth hormone.
Biochem. J. 85, 390 (1962)
54. ILLIG, R., M. ZACHMAN, A. PRADER:
Menschliches Wachstumshormon.
Klin. Wschr. 47, 117 (1969)
55. IRIE, M., R.J. BARETT:
Immunologic studies of human growth hormone.
Endocrinology 71, 277 (1962)
56. KABAT, F.A., M.M. MAYER:
Experimental immunochemistry.
Charles C. Thomas, Springfield, Illinois USA,
1961.
57. KAPLAN, S.L., M.M. GRUMBACH:
Growth hormone secretion in the human fetus and
in anencephalic.
Pediat. Res. 1, 308 (1967)

58. KRULICH, L., A.P.S. DHARIWAL, S.M.McCANN:
Stimulatory and inhibitory effects of
purified hypothalamic extracts on growth
hormone release from rat pituitary in
vitro.
Endocrinology 83, 783 (1968)
59. KRULICH, L.:
Hypothalamic regulation of the secretion of
growth hormone.
Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 184, 179 (1974)
- 59a. KRULICH, L., S.M.McCANN:
Influence of stress on the growth hormone
(GH) content of the pituitary of the rat.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 122, 612 (1966)
60. LABHART, A.:
Klinik der inneren Sekretion.
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York,
1971.
61. LAMBERT, A.E., A.LUICKX, G.R.ZAHND:
Improvement of human growth hormone immunoassay
using ¹²⁵I.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 126, 405 (1967)
62. LANDON, J., J.GIRARD, F.C.GREENWOOD:
The specificity of a radioimmunoassay for human
plasma ACTH.
In: Protein and Polypeptide Hormones.
Ed. M. Margoulies, Excerpta med. (Amst.)
ICS 161, 29 (1968)
63. LI, C.H., W.K.LIU, J.S.DIXON:
Human pituitary growth hormone. XII. The amino
acid sequence of the hormone.
J.Amer.Chem.Soc. 88, 2050 (1966)
64. LI, C.H., J.S.DIXON:
Human pituitary growth hormone. XXXII. The primary
structure of the hormone: Revision.
Arch.Biochem.Biophys. 146, 233 (1971)
65. LI, C.H., J.S.DIXON, D.CHUNG:
Primary structure of the human chorionic
somatomammotropin (HCS) molecule.
Science 173, 56 (1971)
66. MACMILLAN, D.R., J.M.SCHMID, S.A.EASH, C.H.READ:
Studies on the heterogeneity of serum binding
of human growth hormone.
J.Clin.Endocr. 27, 1090 (1967)

67. MARSCHNER, I., F.ERHARDT, P.C.SCRIBA:
Calculation of the radioimmunoassay standard
curve by "spline function".
In: Radioimmunoassay and related procedures
in medicine. Band I.
Eds. E.J.Garcia, E.H.Belcher,
IAEA Wien, 1974.
68. MELANI, F.:
Pro-hormones in tissue and in circulation.
Horm.Metab.Res. 6, 1 (1974)
69. MERIMÉE, T.J., D.A.LILLICRAP, D.RABINOWITZ:
Effect of arginine on serum levels of human
growth hormone.
Lancet II, 1965, 668.
70. MERIMÉE, T.J., D.RABINOWITZ, L.RIGGS, J.A.BURGESS,
D.J.RIMOIN, V.A.McKUSIEK:
Plasma growth hormone after arginine infusion:
Clinical experiences.
New Engl.J.Med. 276, 434 (1967)
71. NADEAU, A., G.R.ZAHND:
Corrections for protein interference in rat
growth hormone immunoassay.
In: Immunological methods in endocrinology.
Eds. K.Federlin, C.N.Hales, J.Kracht,
Thieme-Verlag, Stuttgart, 1971.
72. PARKER, M.L., L.JARETT, D.S.SCHALCH, D.M.KIPNIS:
Rat growth hormone: Immunofluorescent and
radioimmunologic studies.
Endocrinology 76, 928 (1965)
73. PFEIFFER, E.F., F.MELANI:
Menschliches Wachstumshormon: Darstellung,
Bestimmung im Blute und klinische Bedeutung.
Dtsch.med.Wschr. 93, 846 (1968)
74. PHARMACIA FINE CHEMICALS:
Sephadex: Gelfiltration in Theorie und Praxis.
Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden,
1966.
75. PORATH, J., P.FLODIN:
Gelfiltration: A method for desalting and group
separation.
Nature 183, 1657 (1959)
76. RABEN, M.S.:
Human growth hormone.
Rec.Progr.Horm.Res. 15, 71 (1959)

77. RIGOPOULOU, D., J.VALVERDE, J.MARCO, G.FALOONA,
R.H.UNGER:
Large glucagon immunoreactivity in extracts
of pancreas.
J.Biol.Chem. 245, 496 (1970)
78. ROBERTSON, G.L., L.A.KLEIN, J.ROTH, P.GORDON:
Immunoassay of plasma vasopressin in man.
Proc.Nat.Acad.Sci. 66, 129 (1970)
79. RODBARD, D., P.L.RAYFORD, G.T.ROSS:
Statistical quality control of radioimmunoassay.
In: Statistics in Endocrinology.
Eds. J.W.McArthur, Th.Coltar,
The MIT-Press, Boston, 1970.
80. ROOS, P., H.R.FEVOLD, C.A.GEMZELL:
Preparation of human growth hormone by gel-
filtration.
Biochim.Biophys.Acta 74, 525 (1963)
81. ROOT, A.W.:
Human pituitary growth hormone.
Charles C.Thomas Publ., Springfield, Illinois, 1972.
82. ROSA, U.:
A method for protein labelling with radioiodine.
Nuklearmedizin, Beilage zu Atompraxis, 6 (1966)
83. ROSSELIN, G., R.ASSAN, R.S.YALOW, S.A.BERSON:
Separation of antibody-bound and unbound peptide
hormones labelled with iodine-131 by talcum
powder and precipitated silica.
Nature 212, 355 (1966)
84. ROTH, J.S., S.M.GLICK, R.S.YALOW, S.A.BERSON:
Hypoglycemia: A potent stimulus to secretion of
growth hormone.
Science 140, 987 (1963)
85. ROTH, J.S., S.M.GLICK, R.S.YALOW, S.A.BERSON:
Secretion of human growth hormone: Physiologic
and experimental modification.
Metabolism 12, 577 (1963)
86. ROTH, J.S., P.GORDON, J.PASTAN:
Big insulin: A new component of plasma insulin
detected by immunoassay.
Proc.Nat.Acad.Sci. 61, 138 (1968)
87. SCHALCH, D.S., M.L.PARKER:
A sensitive double antibody immunoassay for human
growth hormone in plasma.
Nature 203, 1141 (1964)

88. SCHALCH, D.S., S.REICHLIN:
Plasma growth hormone concentration in the rat determined by radioimmunoassay: Influence of sex, pregnancy, lactation, anesthesia, hypophysectomy and extrasellar pituitary transplants.
Endocrinology 79, 275 (1966)
89. SCHRÖDER, K.E.:
Radioimmunoassay for human growth hormone: Problems and characteristics.
In: Immunological methods in endocrinology. Eds. K.Federlin, C.N.Hales, J.Kracht. Thieme-Verlag, Stuttgart, 1971.
90. SCRIBA, P.C., K.v.WERDER, K.SCHWARZ:
Hypothalamus und Hypophyse.
In: Klinische Pathophysiologie. Ed. W. Siegenthaler, 2. Aufl. Thieme-Verlag, Stuttgart, 1973.
91. SINGH, N.P., B.K.SEAHEY, V.P.RICE, T.LINDSEY, U.J.LEWIS:
Modified forms of human growth hormone with increased biological activities.
Endocrinology 94, 883 (1974)
92. STACHURA, M.E., L.A.FROHMAN:
"Large" growth hormone: Ribonucleic acid-associated precursor of other growth hormone forms in rat pituitary.
Endocrinology 94, 701 (1974)
93. STEINER, D.F., D.CUNNINGHAM, L.SPIGELMAN, B.ATEN:
Insulin biosynthesis: Evidence for a precursor. Science 157, 697 (1967)
94. STEINER, D.F., P.OYER:
The biosynthesis of insulin and a probable precursor of insulin by human islet cell adenoma. Proc.Nat.Acad.Sci. 57, 473 (1967)
95. TOUBER, J.B., P.MAINGUY:
Heterogeneity of human growth hormone. Its influence on a radioimmunoassay of the hormone in serum.
Lancet 1, 1403 (1963)
96. TSUSHIMA, T., H.G.FRIESEN:
Radioreceptor assay for growth hormone. J.Clin.Endocrinol.Metab. 37, 334 (1973)

97. UTIGER, R.D., M.L.PARKER, W.H.DAUGHADAY:
Studies on human growth hormone. I.A radioimmuno-
assay for hGH.
J.Clin.Invest. 41, 254 (1962)
98. VARMA, S.K., P.H.SÖHNKSEN, K.VARMA, J.S.SÖLDNER,
H.A.SELENKOW, K.EMERSON:
Measurement of human growth hormone in pregnancy
and correlation with human placental lactogen.
J.Clin.Endocr. 32, 328 (1971)
99. WERDER, K.von, K.SCHWARZ:
Regulation der Sekretion von Wachstumshormon
beim Menschen.
Dtsch.med.Wschr. 96, 2012 (1971)
100. WERDER, K.von, P.BOTTERMANN, P.HARTMANN, K.SCHWARZ:
Die Bedeutung der oralen Glukosebelastung bei
der Diagnose der Akromegalie.
Med.Klinik 67, 1398 (1972)
101. WERDER, K.von, C.DESALM, P.BOTTERMANN:
Acute effect of human growth hormone on glucose
tolerance and insulin secretion.
VIII. Congress of the International Diabetes
Federation 1973,
Excerpta med. (Amst.) ICS 280, 40 (1973)
102. WERDER, K.von, B.SCHULTZ, S.GALLENBERGER:
Heterogeneity of pituitary and serum growth
hormone in the rat.
Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 184, 4 (1974)
103. WERDER, K.von, C.DESALM, S.GALLENBERGER, M.GOTTSMANN,
P.C.SCRIBA:
Radioimmunologic behaviour of endogenous and
exogenous human growth hormone.
In: Radioimmunoassay and related procedures in
clinical medicine and research, Bd. I.
Eds. E.J.Garcia, E.H.Belcher,
IAEA, Wien, 1974.
104. WERDER, K. von:
Wachstumshormone und Prolaktinsekretion des
Menschen.
Urban & Schwarzenberg Verlag, München-Berlin-Wien,
1975.
105. WESTPHAL, O.:
Human growth hormone: A methodological and
clinical study.
Acta Paed.Scand.Suppl. 182 (1968)

106. WIDE, L., J.PORATH:
Radioimmunoassay of proteins with the use of
Sephadex-coupled antibodies.
Biochim.Biophys.Acta (Amst.) 130, 257 (1966)
107. WRIGHT, D.R., A.D.GOODMAN, K.D.TRIMBLE:
Studies on "big" growth hormone from human
plasma and pituitary.
J.Clin.Invest. 54, 1064 (1974)
108. YADLEY, R.A., A.CHRAMBACH:
Isohormones of human growth hormone.
II. Plasmin-catalysed transformation and
increase in prolactin biological activity.
Endocrinology 93, 858 (1973)
109. YADLEY, R.A., D.RODBARD, A.CHRAMBACH:
Isohormones of human growth hormone. III.
Isolation by preparative polyacrylamide gel
electrophoresis and characterization.
Endocrinology 93, 866 (1973)
110. YALOW, R.S., S.A.BERSON:
Immunoassay of endogenous plasma insulin in man.
J.Clin.Invest. 39, 1157 (1960)
111. YALOW, R.S., S.A.BERSON:
Radioimmunoassay of human growth hormone in
plasma. Principles, practises and techniques.
In: Proceedings of the I.International
Symposium on Growth Hormone.
Eds. A.Pecile, E.E.Müller,
ICS 158, Amsterdam 1968.
112. YALOW, R.S., S.A.BERSON:
Further studies on the nature of immunoreactive
gastrin in human plasma.
Gastroenterology 60, 203 (1971)
113. YALOW, R.A., S.A.BERSON:
And now, "big-big" gastrin.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 48, 391 (1972)
114. YALOW, R.S., S.A.BERSON:
"Big-big" insulin.
Metabolism 22, 703 (1973)
115. YALOW, R.S., S.A.BERSON:
Characteristics of "big-ACTH" in human plasma
and pituitary extracts.
J.Clin.Endocrinol.Metab. 36, 415 (1973)

Lebenslauf

Am 12. Juli 1949 wurde ich als erstes Kind des Landwirts August Gallenberger und seiner Ehefrau Theresia, geb. Holzapfel, in Irnsing, Landkreis Kelheim, geboren.

Von 1955 bis 1960 besuchte ich die Volksschule in Irnsing. Im September 1960 trat ich in das Albertus-Magnus-Gymnasium in Regensburg ein, an dem ich im Juni 1969 das Abitur ablegte.

Vom Wintersemester 1969 bis zum Sommersemester 1975 studierte ich an der Ludwig Maximilians-Universität in München Humanmedizin. Im April 1972 bestand ich das Physikum, im Juli 1975 das Medizinische Staatsexamen.

Von September 1975 bis Februar 1976 arbeitete ich an der II. Medizinischen Klinik der Universität München, seit März 1976 bin ich an der Chirurgischen Universitätsklinik als Medizinalassistent tätig.

Am 24. Oktober 1975 heiratete ich die Medizinalassistentin Erika de la Fuente Mitscherlich.

Die vorliegende Arbeit begann ich im Oktober 1972 im Labor für experimentelle Endokrinologie der II. Medizinischen Universitätsklinik.

difo-druck · 8600 bamberg
untere königstraße 30